

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutické technologie

**Fázové chování lipidických modelů stratum corneum I.**

RIGORÓZNÍ PRÁCE

Hradec Králové, 2008

Mgr. Veronika Priečková

Děkuji RNDr. Marii Musilové, Csc. za odborné vedení, všestrannou pomoc a ochotu při vypracování této rigorózní práce.

## Abstrakt

Během padesátých až sedmdesátých let bylo prokázáno vědeckými skupinami, že kožní bariéra je situována ve stratum corneum a určují ji lipidy v extracelulárních prostorech této vrstvy. Podstatou bariérové funkce je jedinečné chemické složení a strukturní uspořádání jednotlivých složek lipidové matrix. Hlavními složkami lipidové matrix jsou ceramidy, cholesterol a mastné kyseliny. Během posledních 30 let bylo navrženo několik teoretických modelů, které vystihují strukturu a funkci kožní bariéry. Teoretický model by našel své uplatnění při experimentálních studiích zabývajících se onemocněním kůže, permeabilitou kůže, topickým podáváním léčiv, ochranou kůže atd. Konečný model však stále nebyl nalezen a hledá se odpověď na klíčové otázky, zda je lipidová matrix tvořena jednotnou gelovou fází anebo zda se jedná o koexistenci krystalické a gelové fáze a je-li přítomná samostatná fáze kapalných krystalů.

V této práci využíváme diferenční skenovací kalorimetrii (DSC) k analýze cholesterolu, syntetického ceramidu a směsí cholesterolu, syntetického ceramidu a kyseliny olejové. Abychom se mohli zaměřit na úlohu jednotlivých složek, použili jsme zjednodušené in vitro připravené modely a soustředili jsme se na způsob a podmínky přípravy vzorku a jeho fázové chování.

Cílem práce je najít nejvhodnější podmínky pro přípravu homogenních a zcela hydratovaných směsí, dále vyhodnocení chování vzniklých směsí pomocí DSC a zachycení jejich makroskopického a mikroskopického vzhledu v průběhu jednotlivých cyklů hydratace.

## Abstract

From the 50s to the 70s it has been shown that the human skin barrier primarily is located at the extracellular lipid matrix of stratum corneum. The barrier capacity is a function of the physical state and structural organization of extracellular lipid matrix. The lipid matrix is essentially composed of very long chain saturated ceramides, cholesterol and free fatty acids. Since then several models for the structure and function of the mammalian skin barrier have been proposed, but some main unsolved problems with respect to lipid organization still exist. Whether the extracellular lipid matrix is constituted by single gel-phase or if there is a coexistence of several crystalline (solid) and gel-phases, whether a separate fluid phase is present? Such a theoretical model may provide for a rational design of experimental studies on skin diseases, skin permeability, topical drug administration, skin protection, etc.

In this work we are using differential scanning calorimetry (DSC) to analyse the thermotropic phase behavior of cholesterol, synthetic ceramid and in vitro prepared mixtures composed of cholesterol, synthetic ceramid and oleic acid. We are using simplified models and we focus on the sample preparation method and on the effects of substances on the phase behaviour of the model.

The aim of this work is to find the most suitable conditions of the preparation of homogeneous and fully hydrated mixtures, to investigate the thermotropic phase behaviour of the samples by DSC and monitoring the samples by the light microscopy.

# OBSAH

<b>1.</b>	<b>ÚVOD</b>	6
<b>2.</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST</b>	7
2.1	Stavba a funkce stratum corneum.	7
2.2	Pevné látky.	7
2.2.1	Vnitřní struktura pevných látek	7
2.2.2	Krystalová mřížka.	8
2.2.3	Kapalné krystaly.	8
2.2.4	Polymorfie.	10
2.3	Cholesterol.	11
2.3.1	Cholesterol a jeho chemická struktura	11
2.3.2	Fázové chování cholesterolu.	12
2.4	Voda.	14
2.5	Ceramidy	15
2.6	Struktura kožní bariéry.	18
2.6.1	Teoretické modely kožní bariéry.	18
2.6.2	Vytvoření in vitro lipidového systému.	20
<b>3.</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b>	21
3.1	Pracovní úkol	21
3.2	Seznam surovin	22
3.3	Použité přístroje	23
3.4	Postup práce	24
3.4.1	Příprava vzorků pro měření na DSC	24
3.4.2	Příprava preparátů pro mikroskopii	25
3.4.3	Seznam vzorků a nastavení parametrů pro měření na DSC.	26
3.5	Výsledky experimentu	28
3.5.1	Cholesterol, DSC.	28
3.5.2	Syntetický ceramid, DSC.	37
3.5.3	Směs cholesterolu a syntetického ceramidu, DSC.	42
3.5.4	Směs cholesterolu, syntetického ceramidu a kyseliny olejové, DSC.	54
3.5.5	Makroskopické vzorky	60
3.5.6	Mikroskopie.	68
3.6	Diskuze	84

3.6.1	Hodnocení DSC záznamů cholesterolu. . . . .	84
3.6.2	Hodnocení DSC záznamů syntetického ceramidu. . . . .	85
3.6.3	Hodnocení DSC záznamů směsí cholesterolu a syntetického ceramidu. .86	
3.6.4	Hodnocení DSC záznamů směsi cholesterolu, syntetického ceramidu a kyseliny olejové . . . . .	87
3.6.5	Makroskopické hodnocení vzorků . . . . .	88
3.6.6	Hodnocení mikroskopických preparátů . . . . .	89
<b>4.</b>	<b>ZÁVĚR.</b> . . . . .	<b>91</b>
4.1	DSC. . . . .	91
4.2	Makroskopický vzhled vzorků. . . . .	92
4.3	Mikroskopické preparáty. . . . .	92
<b>5.</b>	<b>LITERATURA</b> . . . . .	<b>93</b>

# 1. ÚVOD

Během padesátých až sedmdesátých let bylo prokázáno mnohými vědeckými skupinami, že kožní bariéra je situována ve stratum corneum (rohová vrstva) a určují ji lipidy v intercelulárních prostorech této vrstvy. Od té doby se postupně vyvíjí pohled na vytvoření teoretického modelu, který by vystihoval strukturu a funkci kožní bariéry.

K bližšímu poznání vlastností a struktury tuhých látek lze využít metody termické analýzy. Termická analýza je soubor početných metod založených na měření změn určité fyzikální vlastnosti látky při změnách teploty. Podle použité techniky nebo měřené fyzikální vlastnosti je lze rozdělit na diferenční termickou analýzu, diferenční skenovací kalorimetrii, termogravimetrii, termochemickou analýzu.

V diplomové práci Termální analýza interakcí epidermálních lipidů I, jsme ověřili, že diferenční skenovací kalorimetrie ( DSC ) je vhodnou a sensitivní metodou pro monitorování strukturních změn ve vodných disperzích lipidů, výhodou této metody je její rychlost a spotřeba velmi malého množství vzorku. V této navazující rigorózní práci využíváme DSC k analýze jednotlivých složek intercelulárního prostoru rohové vrstvy, a to cholesterolu, ceramidu, mastných kyselin a jejich směsí.

Abychom eliminovali interindividuální vlastnosti živé tkáně a mohli se tak zaměřit na úlohu jednotlivých složek, použili jsme zjednodušené in vitro vytvořené modely pomocí syntetického ceramidu, cholesterolu a kyseliny olejové. Neboť nezáleží pouze na složení směsi, ale klíčovou roli hrají podmínky zvolené při přípravě vzorků.

Cílem této práce je nalézt nejvhodnější podmínky pro přípravu homogenních a hydratovaných směsí, dále vyhodnocení chování vzniklých směsí pomocí DSC a zachycení jejich makroskopického a mikroskopického vzhledu v průběhu jednotlivých cyklů hydratace.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Stavba a funkce stratum corneum

Hlavní funkcí kůže je chránit organismus proti vnějším vlivům prostředí. Stratum corneum (rohová vrstva) je nejsvrchnější vrstvou kůže a je zodpovědná za její bariérovou funkci. Podstatou chování rohové vrstvy je její jedinečné chemické složení a uspořádání jednotlivých složek.<sup>1</sup>

Rohová vrstva je tvořena plochými, do sebe zapadajícími buňkami vyplněnými kreatinem (korneocyty) a intercelulární lipidovou matrix. Hlavními složkami lipidové matrix jsou ceramidy (50%), cholesterol (25%) a mastné kyseliny (10%). Pro hlubší pochopení bariérové funkce kůže je nutné znát strukturu a vzájemné uspořádání složek extracelulární lipidové matrix.<sup>2,3,4</sup> Stále se hledá odpověď na klíčové otázky, zda je lipidová matrix tvořena jednotnou gelovou fází anebo zda se jedná o koexistenci krystalické a gelové fáze a je-li přítomná samostatná fáze kapalných krystalů.<sup>5</sup>

### 2.2 Pevné látky

#### 2.2.1 Vnitřní struktura pevných látek

Pevné látky jsou tvarově stálé, jestliže na ně nepůsobí vnější síly. Stavebními částicemi vnitřní struktury pevných látek mohou být molekuly, ionty, určitá seskupení atomů a někdy i jednotlivé atomy, podle chemické povahy příslušné látky. Částice pevné látky jsou vázány ve svých fixních polohách, kolem kterých vykonávají kmitavý pohyb, na rozdíl od kapalin se tyto rovnovážné polohy nepřemísťují a výměna místa se sousední částicí nastává u pevných látek jen výjimečně.

Podle uspořádání částic můžeme pevné látky rozdělit na dvě odlišné skupiny, a to na krystalické a amorfní. Krystalické látky jsou charakterizovány pravidelným, periodicky se opakujícím uspořádáním stavebních jednotek, z nichž jsou složeny. Struktura krystalu je tak určená základní jednotkou vzoru, nazývanou jednotková buňka, jejíž periodické opakování ve třech rozměrech tvoří krystalovou mřížku.

Krystaly jsou až na výjimky anizotropní. Pojmeme anizotropní rozumíme vlastnosti, které závisí na směru, podél něhož je měříme. Dále se krystaly vyznačují ostrou teplotou tání, čím ostřejší, čím jsou krystaly méně narušené a čím je příslušná krystalická látka chemicky čistší. Zvyšováním teploty roste amplituda oscilací a kinetická energie všech stavebních částic, protože krystalická mřížka je uniformní a stavební jednotky jsou zde fixovány stejně pevně, zhrouť se celá mřížka najednou při teplotě tání. Krystalická látka se táním změní na kapalinu.

Většina organických sloučenin tvoří molekulární krystaly. Molekuly jsou v krystalu vázány přitažlivými silami, jejichž velikost je malá ve srovnání s ostatními typy vazeb

(iontová, kovalentní, kovová vazba). Slabá vazba je důvodem, proč mají molekulární krystaly nízký bod tání. Krystaly iontových organických kyselin a zásad mívají vyšší teploty tání. Anorganické sloučeniny se vyznačují především iontovými krystaly s vysokými teplotami tání.

Amorfní látky nemají pravidelnou krystalickou strukturu, uspořádání částic je v těchto látkách náhodné. Určité zákonitosti existují pouze v polohách navzájem sousedících atomů. Amorfní látky jsou považovány za izotropní, tj. mají ve všech směrech stejné fyzikální vlastnosti. Při zahřívání amorfní látky postupně měknou, až do teploty, kdy se rozpustí, jejich bod tání je neostrý.<sup>6</sup>

### 2.2.2 Krystalová mřížka

Krystalová mřížka je podle idealizované geometrické představy soubor bodů pravidelně rozmístěných v prostoru. Spojením těchto bodů vznikne síť přímek, která rozloží prostor na rovnoběžnostěny, označované jako elementární buňky, což jsou nejmenší části krystalové mřížky. Elementární buňka popisuje strukturu krystalu čistě geometricky, bez ohledu na to, jakým druhem vazeb se krystalická mřížka udržuje pohromadě. Elementární buňkou se tedy popisují krystaly všech druhů, a to molekulové, iontové, atomové, krystaly s kovovou vazbou i vrstevnaté krystaly. Existuje 14 základních prostorových mřížek, které se podle autora jejich prvního odvození nazývají Bravaisovy mřížky. Bravaisovy mřížky dělíme na základě jejich symetrie do sedmi krystalografických soustav. Symetrii objektu popisujeme grupou operací symetrie. Při popisu bodové symetrie vnějších krystalových tvarů se uplatňuje celkem 32 krystalografických bodových grup neboli krystalografických oddělení souměrnosti.<sup>6</sup>

### 2.2.3 Kapalné krystaly

Kapalné krystaly představují stav hmoty mezi anizotropní pevnou fází a izotropní kapalnou fází (obr.1), byly objeveny v roce 1888 botanikem Friedrichem Reinitzerem působícím na německé části Karlovy univerzity. Výzkum v oblasti kapalných krystalů prošel v uplynulých letech rychlým vývojem.

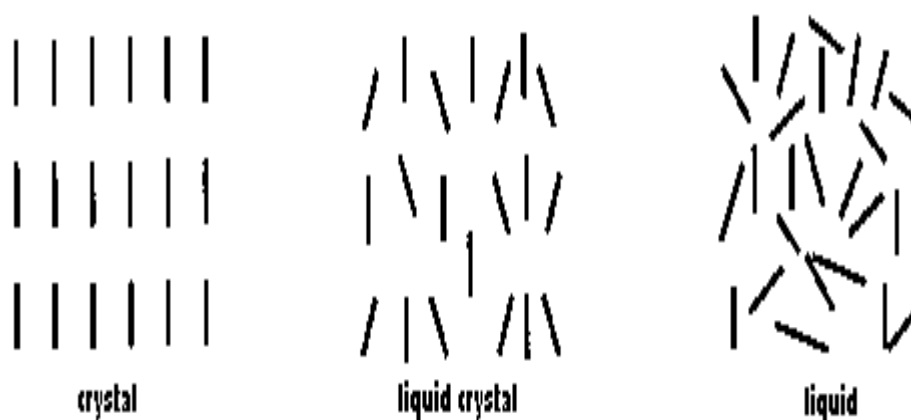
Tvorba kapalně-krystalických fází v organických molekulách je projevem spontánního uspořádávání indukované tvarem těchto molekul, snížením jejich symetrie a specifickými interakcemi mezi nimi (tzv. segregace mikrobází). Pro samoskladbu existuje mnoho příčin, avšak molekulární princip je vždy jednoduchý: anizotropní nebo amfifilní molekuly vytvářejí



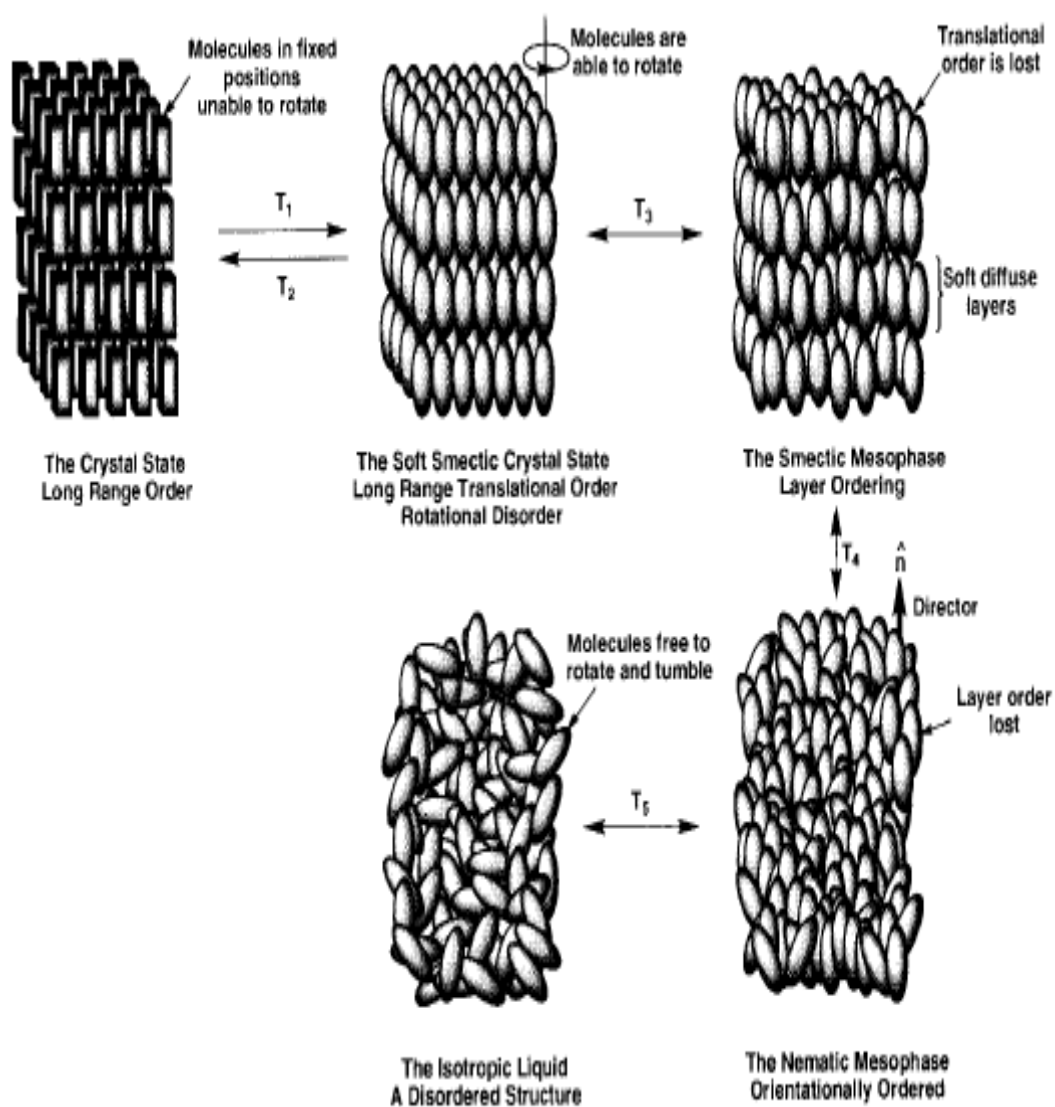
jednoduché stavební bloky, které dostačují k vybudování supramolekulárních systémů. Kapalně-krystalický agregátní stav systému reprezentuje kombinaci vlastností jak krystalické látky (optická a elektrická anizotropie, uspořádanost) tak kapalně fáze (molekulární mobilita), proto je označován jako mezomorfni fáze zkráceně mezofáze.

Kapalné krystaly můžeme rozdělit na dvě základní skupiny: thermotropní a lyotropní. Vznik i zánik mezofází v thermotropních kapalných krystalech čisté látky nastává pouhou změnou teploty a stabilita mezofází se pohybuje v určité teplotní oblasti. Lyotropní kapalné krystaly se skládají z amfifilních molekul rozpuštěných ve vhodném rozpouštědle (obvykle ve vodě) a tvorba mezofází je řízena koncentrací.<sup>7</sup>

Podle strukturního uspořádání se rozlišuje několik druhů kapalných krystalů, významné jsou zejména smektický a nematický stav. Smektický stav vytvářejí tyčinkovité molekuly, seskupující se paralelně do dobře definovaných rovinných vrstev, jejichž tloušťka odpovídá délce molekul. Při toku se jednotlivé vrstvy po sobě posouvají a molekuly zůstávají orientovány příčně na směr toku. Nematický stav vytvářejí tyčinkovité molekuly bez boční soudržnosti, takže nevznikají vrstvy, ale molekuly se orientují ve vláknité svazky a při toku se pohybují podélně.<sup>6</sup>



Obr.1 Kapalné krystaly představují stav hmoty mezi krystalickou pevnou fází a izotropní kapalnou fází.<sup>8</sup>



Obr.2 Zahříváním krystalu dochází k postupnému rozvolňování krystalové mřížky. Pokud jsou laterální mezimolekulové přitažlivé síly silnější než přitažlivé síly terminálních řetězců, dojde při ohřátí ( $T_1$ ) k jejich přerušení a vznikají smektické mezofáze. Při dalším růstu teploty ( $T_3$ ) vzniká vrstevnatá struktura, ve které již nejsou vrstvy dokonale definovány. Další zvýšení teploty ( $T_4$ ) vede ke vzniku nematické fáze, která má jen orientační uspořádání. Při ztrátě orientačního uspořádání ( $T_5$ ) vznikne izotropní kapalina.<sup>7</sup>

#### 2.2.4 Polymorfie

Některé chemické látky mají schopnost vytvořit vlivem vnějších faktorů (teploty, tlaku) a podmínek krystalizace tuhé soustavy s různým vnitřním uspořádáním. V případě sloučenin

hovoříme o polymorfii a jednotlivé formy, v nichž se sloučenina v tuhém skupenství vyskytuje, jsou polymorfní modifikace této sloučeniny. Změnami teploty a tlaku mohou polymorfní modifikace přecházet jedna na druhou. Polymorfní přeměny, které mohou probíhat obousměrně, nazýváme enantiotropní. Přeměny, které za daných podmínek probíhají jen v jednom směru, nazýváme monotropní.

Pojem polymorfie sloučenin se vztahuje výlučně na vnitřní uspořádání stavebních částic v tuhém skupenství, zejména molekul a iontů, vnější tvar krystalů není proto jednoznačným kritériem polymorfie. Pokud jsou do struktury zabudovány i molekuly solventu (nejčastěji vody), hovoříme o solváttech nebo jsou pro tyto formy používány i jiné pojmy- solvatomorfy, pseudopolymorfy.<sup>6,9</sup>

Odlišné modifikace polymorfní sloučeniny se mohou značně lišit chemickými, fyzikálními i biologickými vlastnostmi. Metody termální analýzy, např. diferenční skenovací kalorimetrie (DSC), jsou jednou z metod vhodných k rozlišení a stanovení jednotlivých polymorfů.

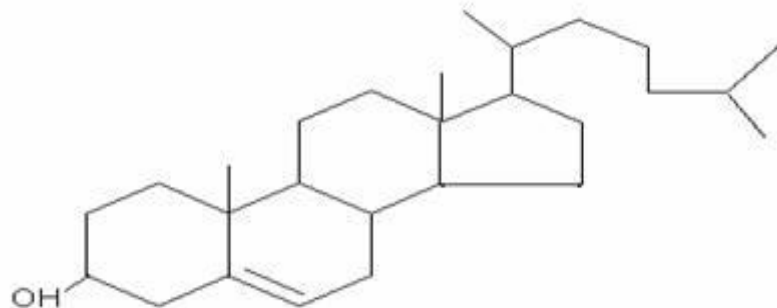
Různé polymorfní modifikace téže sloučeniny se vzhledem k rozdílnému stavu vnitřního uspořádání vyznačují také rozdílnou vnitřní energií. U molekulových sloučenin vyplývají energetické rozdíly především z rozličných interakcí van der Walsovými silami, při různé vzájemné vzdálenosti a orientaci molekul. Polymorfní modifikace látek schopných vytvářet mezimolekulové vodíkové můstky, se často liší právě geometrickým uspořádáním a energií těchto vazeb.

Podle odlišného obsahu energie mají polymorfní modifikace téže sloučeniny také rozdílnou termodynamickou stabilitu a považují se za navzájem různé fáze v daném systému. Změna krystalické modifikace je tedy fázovou přeměnou.<sup>6</sup>

## 2.3 Cholesterol

### 2.3.1 Cholesterol a jeho chemická struktura

Cholesterol se řadí mezi steroidy, jejichž základní skelet tvoří tetracyclický uhlovodík steran. Vyskytuje se ve všech živočišných tkáních. Je součástí membrán především živočišných buněk a zároveň je prekurzorem pro biosyntézu dalších biologicky významných steroidů jako jsou žlučové kyseliny, pohlavní hormony a vitamín D. Cholesterol je ve vodě prakticky nerozpustný, neobsazená OH skupina umožňuje jeho interakci s vodou.<sup>10,11</sup>



Obr.3 Struktura cholesterolu<sup>11</sup>

### 2.3.2 Fázové chování cholesterolu

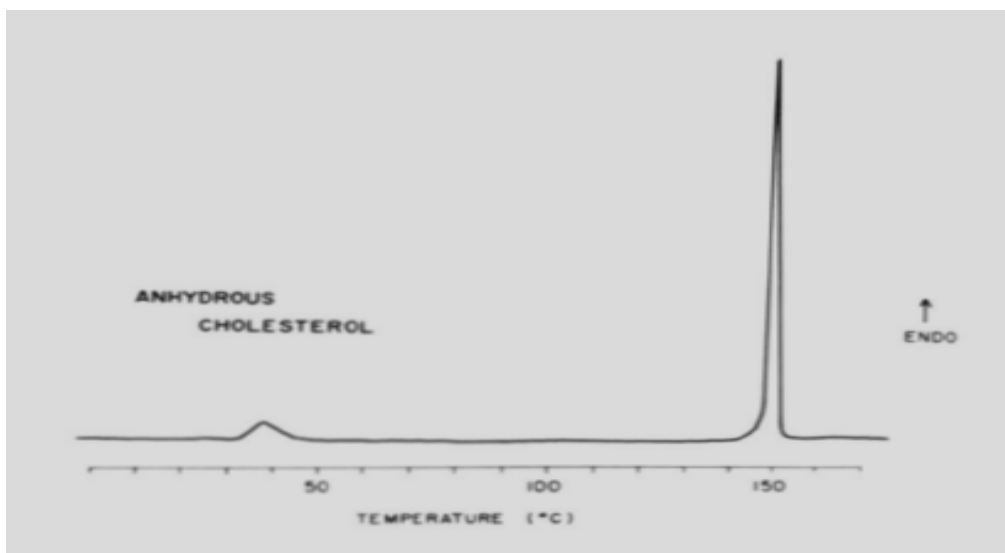
K bližšímu poznání vlastností a struktury tuhých látek lze využít metod termické analýzy. Například diferenční skenovací kalorimetrie (DSC) je vhodnou metodou pro monitorování strukturních změn ve vodných disperzích lipidů, výhodou této metody je její rychlost a spotřeba velmi malého množství vzorku.<sup>12, 13</sup>

Pomocí DSC bylo zjištěno, že thermotropní fázové chování bezvodého cholesterolu se značně liší od cholesterolu monohydrátu. Na DSC záznamech bezvodého cholesterolu jsou viditelné dva enantiotropní přechody: polymorfni krystalická přeměna při 39°C a přeměna z krystalické na kapalnou fázi při 151°C. Zatímco v uzavřeném systému cholesterolu monohydrátu a vody se na DSC záznamech objevují tři reverzibilní endotermní přechody a to při teplotě 86, 123 a 157 °C.<sup>14,15</sup>

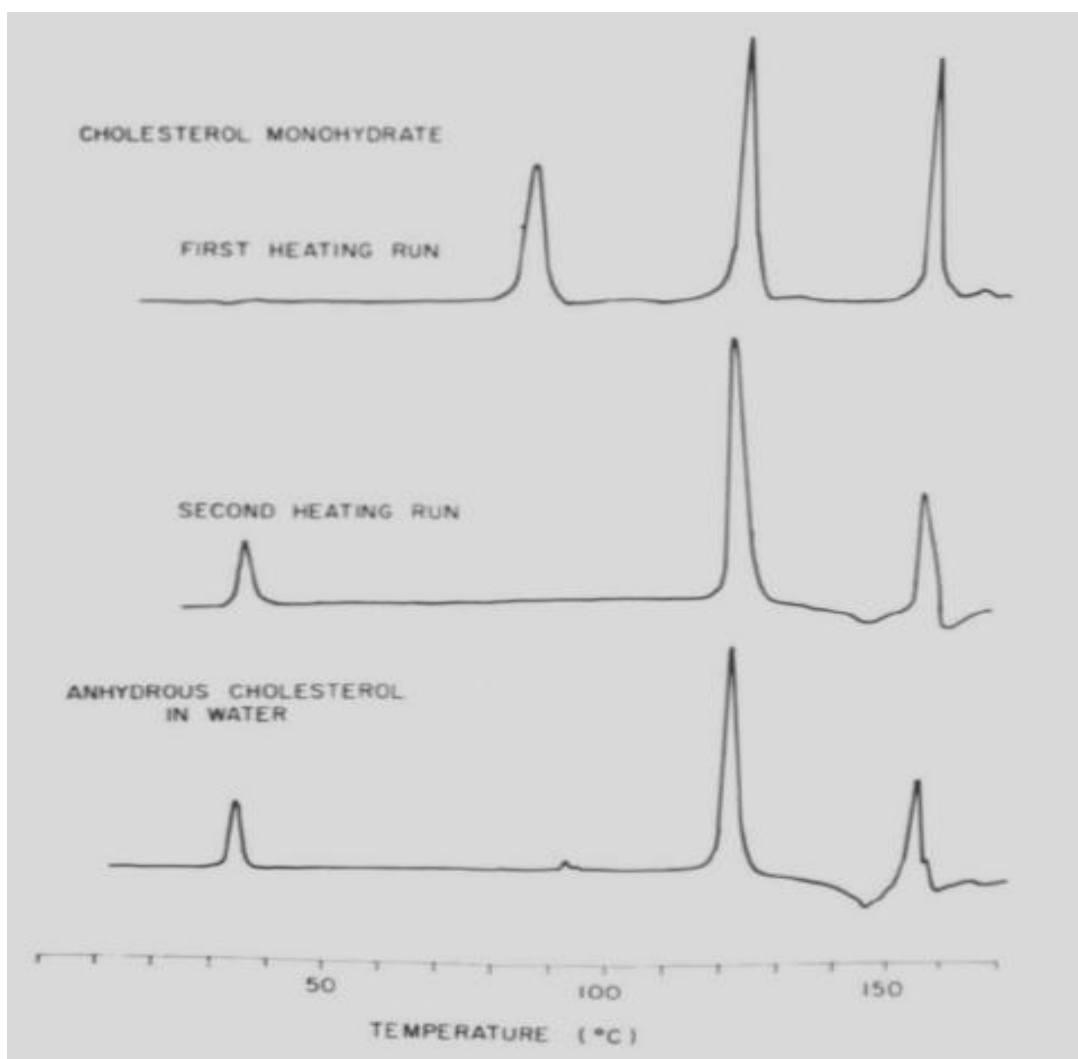
Cholesterol monohydrát ztrácí vodu a přechází polymorfni přeměnou na bezvodý cholesterol při teplotě 86 °C. K opětovné re-hydrataci cholesterolu dochází nejdříve za 24 hodin při pokojové teplotě (22 °C). Poměr hydratace závisí především na polymorfni krystalické formě bezvodého cholesterolu a teplotních podmínkách.<sup>14,16</sup>

Při teplotě 123 °C dochází k ostrému přechodu bezvodého krystalického cholesterolu v přítomnosti nadbytku vody na fázi kapalných krystalů ve smektickém stavu. Fáze kapalných krystalů je stabilní v teplotním rozmezí od 123 do 157 °C, potom dochází k tání a vytváří se kapalina. Výskyt fáze kapalných krystalů hydratovaného cholesterolu by vysvětloval vysokou povrchovou aktivitu a možnost existence vysoké koncentrace cholesterolu v biologických membránách.<sup>14,17,18</sup>

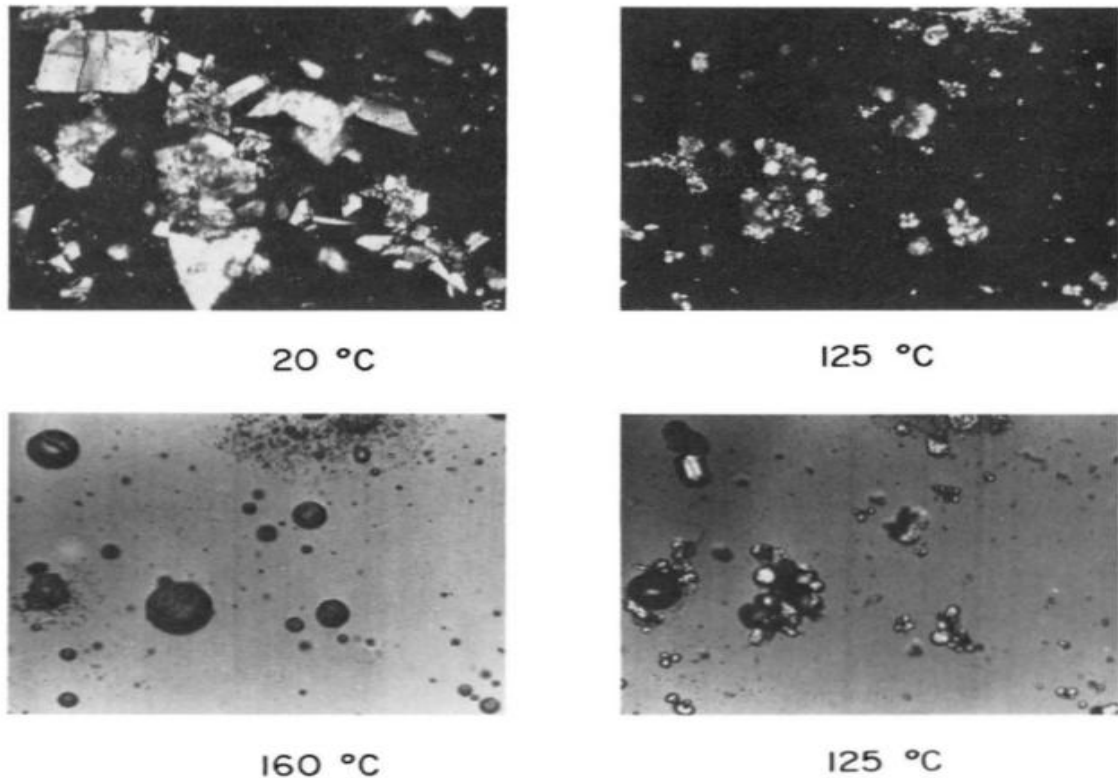
Cholesterol je jednou z důležitých komponent obsažených v intercelulárních prostorech stratum corneum a hraje klíčovou úlohu při zabezpečení bariérové funkce kůže. Cholesterol stabilizuje uspořádání lipidů a tím vytváří mechanicky odolnou gelovou fázi.<sup>19</sup>



Obr.4 DSC záznam bezvodého cholesterolu, měřeno rychlostí 5 °C/min<sup>14</sup>



Obr.5 Srovnání DSC záznamů prvního a druhého ohřevu cholesterolu monohydrátu a záznamu krystalického bezvodého cholesterolu ve vodě , měřeno rychlostí 5 °C/min<sup>14</sup>



Obr.6 Porovnání změn na mikroskopických snímcích cholesterolu monohydrátu ve vodě s měnící se teplotou. Jedná se o snímky stejného pole preparátu, zvětšení 100×. Vlevo nahoře - krystaly cholesterolu monohydrátu, zkřížené nikoly, vlevo dole – kapky rozpuštěného cholesterolu, přímé světlo, vpravo nahoře - kapalné krystaly cholesterolu, zkřížené nikoly, vpravo dole – kapalné krystaly cholesterolu, zkřížené nikoly s vloženým kompenzátořem, známka dvojlomu + <sup>14</sup>

## 2.4 Voda

Za normálních okolností je stratum corneum relativně suchá tkáň, obsahuje okolo 20% vody (m/m).<sup>2</sup> Důležitou úlohou vody ve stratum corneum je spoluúčast na mnoha hydrolytických enzymatických procesech, které umožňují normální deskvamaci. Voda dále vytváří prostředí pro vznik přirozeně zvlhčujících faktorů, což jsou ve vodě rozpustné látky uložené v korneocytech, patří mezi ně aminokyseliny a jejich deriváty, močovina, laktamy aj.<sup>3</sup>

Většina vody je obsažena v korneocytech, zatímco v intercelulárních lamelách je stav hydratace poměrně nízký. Zvýšení hydratace stratum corneum nad 30-40% způsobí nabobtnání korneocytů a dochází tak ke zmenšení bariérové funkce kůže.<sup>4</sup>

Klesne-li obsah vody v rohové vrstvě pod 10%, stává se tato vrstva křehkou, snadno lomivou a umožňuje vstup dráždivých (mýdlo, saponáty aj.). Jestliže chemické dráždění

dosahuje až k malpigické vrstvě (společné označení pro stratum basale a spinosum<sup>20</sup>) epidermis, dojde k ovlivnění dozrávání buněk, keratinizace se stává abnormální a výsledkem je méněcenná rohová vrstva. Hydratace je tedy jeden z důležitých faktorů, který ovlivňuje integritu kožní bariéry.<sup>21</sup>

Diferenční skenovací kalorimetrie byla použita jako vhodná a senzitivní metoda pro vyhodnocení stavu hydratace stratum corneum. DSC termogram byl analyzován na základě množství vázané vody a teploty tání vody ve stratum corneum. Výsledkem bylo zjištění, že 20-30% vody obsažené ve stratum corneum je voda vázaná, která silně interaguje s lipidy nebo proteiny ve stratum corneum. Zbývající voda je volná a vytváří prostředí ve vodě rozpustným látkám, jako jsou aminokyseliny, močovina aj.<sup>22</sup>

Víme, že systémy lipid-voda vykazují polymorfní chování. Počet molekul vody vázané na molekulu lipidu, závisí na typu lipidu a současně na fázovém stavu, ve kterém se systém lipid-voda nachází. Rozlišujeme dva typy vody vázané, a to mrznoucí a nemrznoucí.

Nemrznoucí interlamelární voda je pevně vázaná na molekuly lipidu a i při ochlazení směsi na extrémně nízké teploty nedojde k vytvoření ledu.

Zatímco mrznoucí interlamelární voda interaguje s molekulami lipidu slaběji a má tedy dostatečný prostor pro vytvoření ledu při zchlazení směsi. Na DSC grafech u ní nalezneme charakteristický táhlý endotermní pík v teplotním rozmezí od -40°C do 0°C, jedná se o přeměnu led-voda.

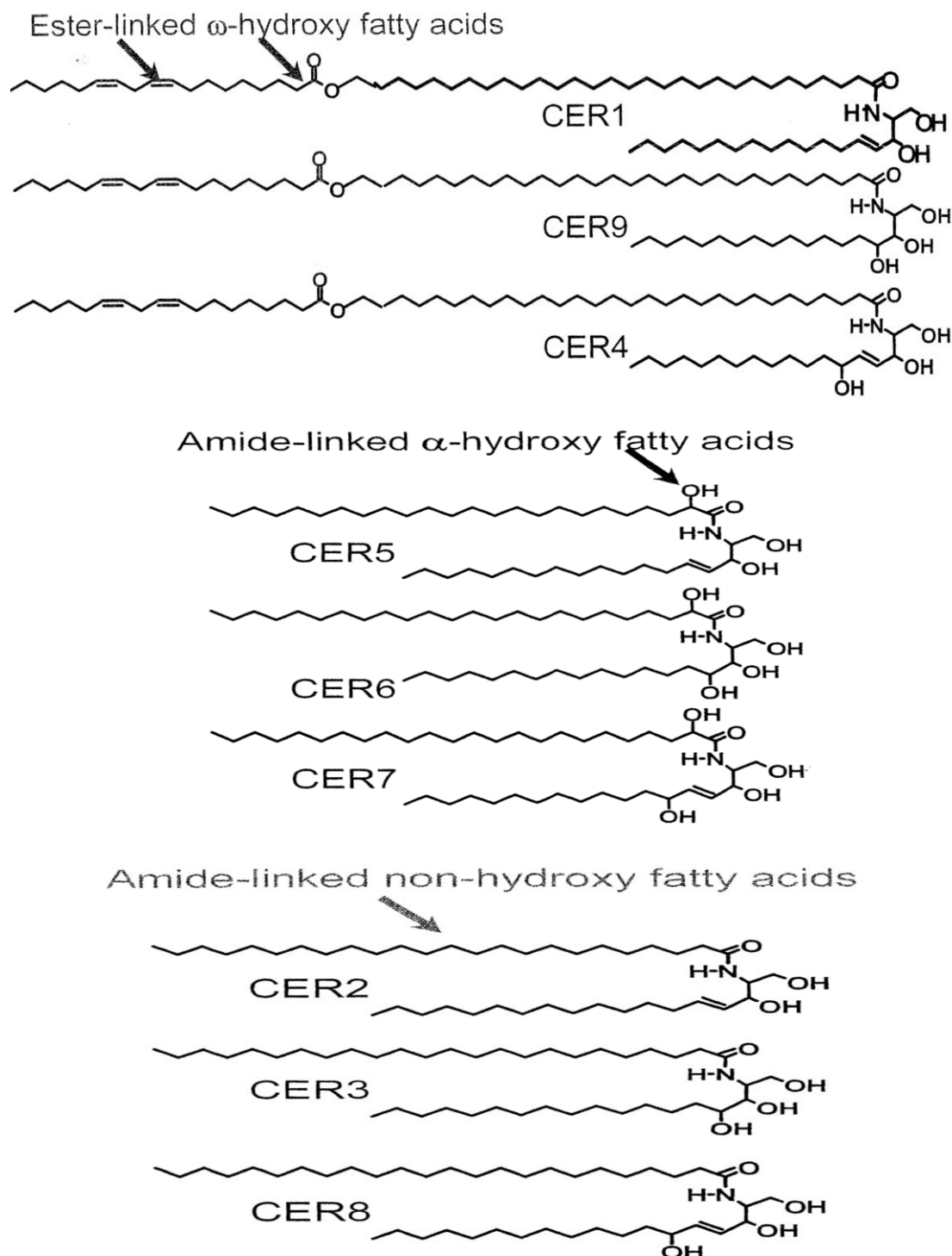
Třetím typem v systému lipid-voda jsou molekuly vody volné, které se nachází mimo lipidové dvojvrstvy. Na DSC grafech je tato přeměna led-voda viditelná, jako ostrý endotermní pík při 0°C.<sup>23, 24, 25, 26</sup>

## 2.5 Ceramidy

Hlavní složkou bariérových lipidů ve stratum corneum jsou ceramidy. Ceramidy tvoří nejdůležitější a nejspecifičtější část lipidové matrix. Zatím bylo popsáno devět typů ceramidů (poslední byl popsán v roce 2003), lišících se stavbou polární hlavy a průměrnou délkou řetězců (obr.7). Základem molekuly ceramidu je bazický alkohol, kterým může být sfingozin, fytosfingozin nebo 6-hydroxysfingozin (obr.8). Na jejich primární aminoskupinu v poloze 2 se amidicky váže mastná kyselina, která může v poloze  $\alpha$  nebo  $\omega$  obsahovat hydroxyskupinu. Délka mastné kyseliny je 16–34 uhlíků v  $\omega$ -hydroxylovaných ceramidech, nejčastěji se vyskytují kyseliny obsahující 24 uhlíků. Zvlášť významné jsou tři typy ceramidů (jedná se o ceramid 1, ceramid 4 a ceramid 9)<sup>27</sup>, které obsahují  $\omega$ -hydroxykyselinu o délce přibližně 30 uhlíků, na jejíž koncový hydroxyl se estericky váže esenciální mastná kyselina, kyselina linolová. Tento typ ceramidu tvoří jakousi matici, okolo které se organizují ostatní ceramidy, ve kterých jsou obsaženy kyseliny s 20 – 24 uhlíky.

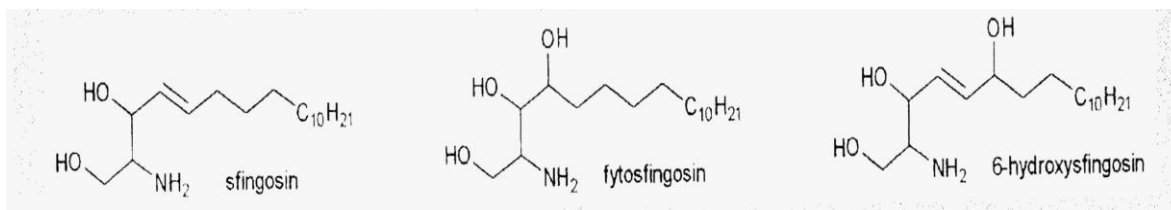
Obecně molekula ceramidu obsahuje polární hlavu a dva hydrofobní řetězce, podobně jako fosfolipidy. Na rozdíl od fosfolipidů, tvořících běžné buněčné membrány, je však polární

hlava ceramidů výrazně menší, což umožňuje těsnější uspořádání těchto lipidů v lamele. Ceramidy mají navíc podstatně delší hydrofobní řetězce, a proto nevytvářejí dvojvrstvy, ale několikavrstvé, vzájemně propojené lamelární struktury. Tyto strukturální znaky vysvětlují, proč je propustnost ceramidových lamel tisíckrát nižší, než je tomu u fosfolipidových dvojvrstev (obr.9).<sup>28</sup>

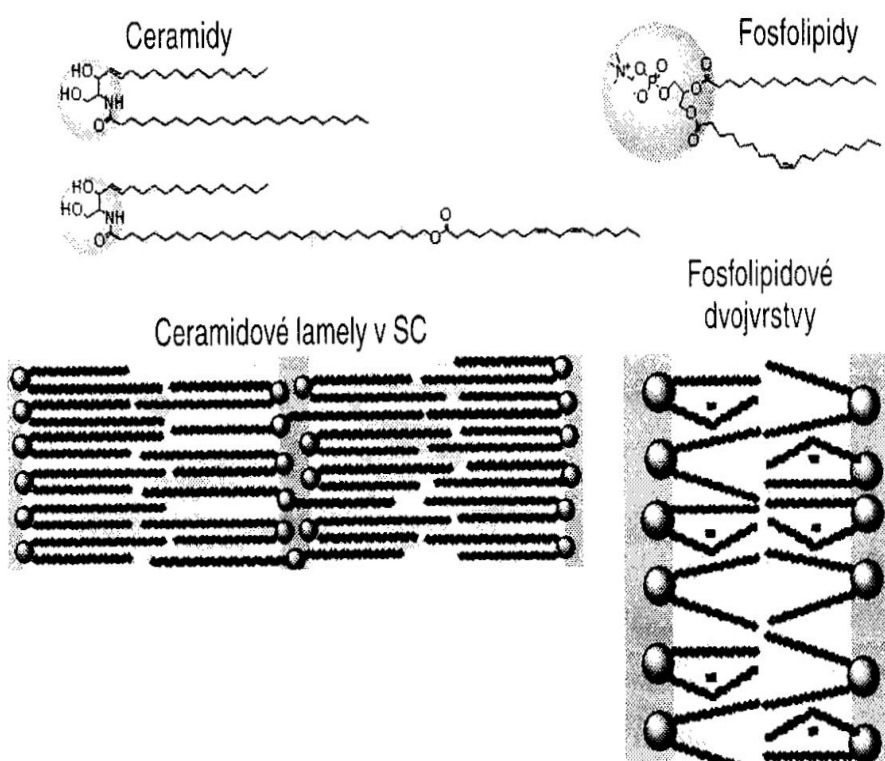


Obr.7. Struktury ceramidů, které jsou hlavní složkou bariérových lipidů ve stratum corneum u člověka<sup>29</sup>





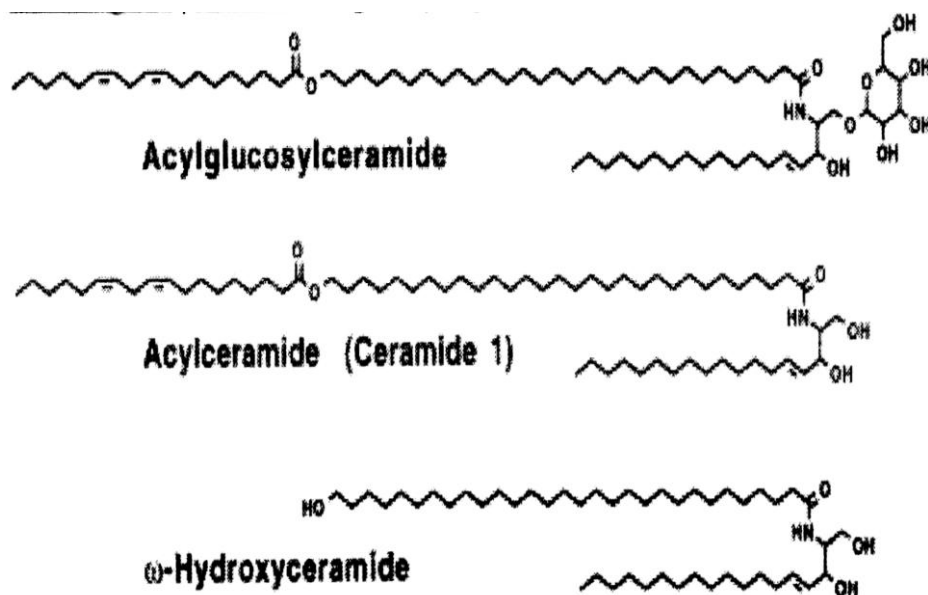
Obr.8 Struktura sfingosinu, fytosfingosinu a 6-hydroxysfingosinu <sup>30</sup>



Obr. 9. Srovnání struktur ceramidů a fosfolipidů a jejich uspořádání v lamelách.<sup>28</sup>

Významnou složkou lamelárních granulí je acylglukosylceramid. AcylGlcCer je po uvolnění obsahu granulí deglukozylován a vzniká z něj acylceramid (ceramid 1), který hraje klíčovou roli v organizaci intercelulární lipidové matrix ve stratum corneum. Kovalentně se váže na vnější stranu korneocytární obálky a vytváří templát pro další uspořádání ceramidů (obr. 10).

Ceramid 1 je jedním ze tří ceramidů obsahujících  $\omega$ -hydroxykyselinu o délce přibližně 30 uhlíků, na jejíž koncový hydroxyl je estericky navázaná kyselina linolová. Nedostatek této esenciální mastné kyseliny je příčinou špatné bariérové funkce kůže. Má vliv na biofyzikální vlastnosti lamel ve stratum corneum a tím zvyšuje propustnost vody.<sup>3</sup>



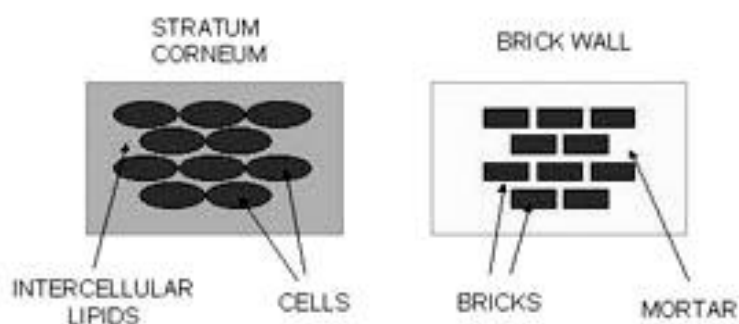
Obr.10 Struktura acylglukosylceramidu, ceramidu 1 a  $\omega$ -hydroxyceramidu.<sup>3</sup>

## 2.6 Struktura kožní bariéry

### 2.6.1 Teoretické modely kožní bariéry

Během padesátých až sedmdesátých let vědci ve svých studiích prokázali, že kožní bariéra je situována ve stratum corneum a určují ji lipidy v intercelulárních prostorech této vrstvy. Od té doby se postupně vyvíjí pohled na vytvoření teoretického modelu, který by vystihoval strukturu a funkci kožní bariéry.<sup>31</sup>

První navrhovaný model je nazýván jako „cihly a malta“, kde korneocyty reprezentují „cihly“ a lipidová matrix v mezibuněčných prostorech „malta“.<sup>30,33</sup> Soudržnost je navíc zajištěna desmosomy, takové uspořádání vytváří komplikovanou cestu pro průnik látek. Tento model je z roku 1975 a jeho autoři jsou Michaels et al.<sup>31</sup>

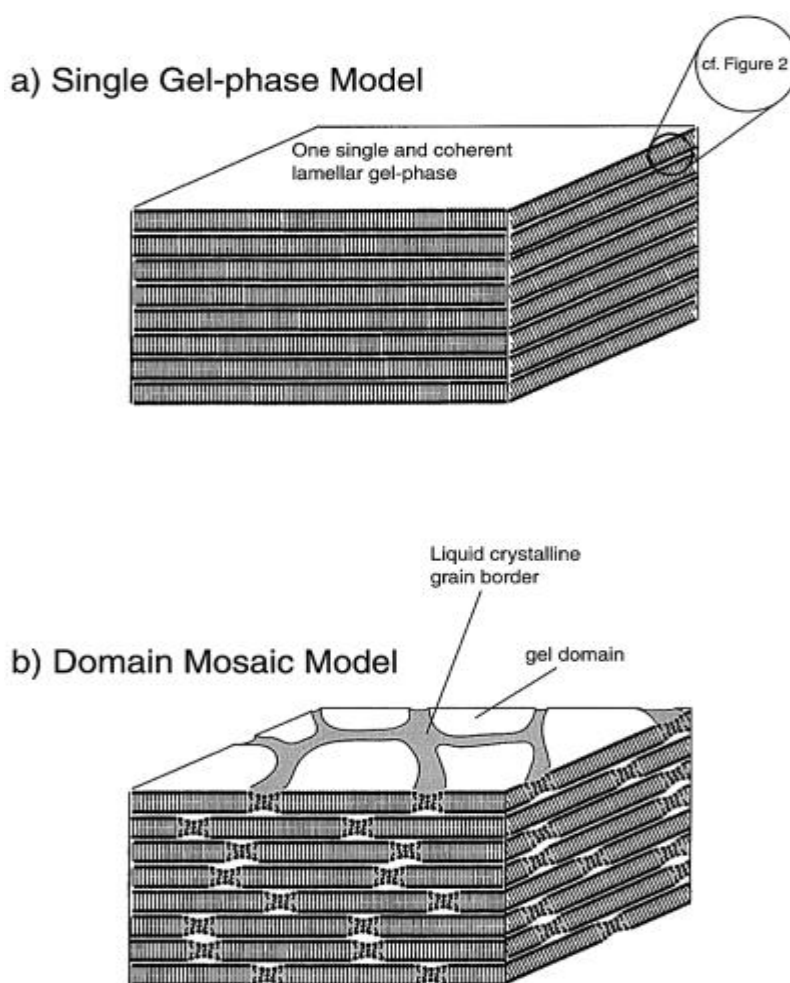


Obr.11 Struktura stratum corneum nazývaná jako „cihly a malta“<sup>34</sup>

Forslind v roce 1994 představuje „doménový-mozaikový model“ (obr.12 b). V tomto modelu existují současně dvě fáze lipidů, a to krystalická fáze a fáze kapalných krystalů.

Norlén ve své práci z roku 2001 zpochybňuje přítomnost fáze kapalných krystalů ve stratum corneum a navrhuje model jednotné gelové fáze v intercelulárním prostoru kožní bariéry (obr.12 a). Zdůrazňuje zde roli cholesterolu, který je obsažen ve stratum corneum v relativně vysoké koncentraci. In vitro cholesterol vytváří lamelární struktury při koncentracích >30 mol%. Avšak příliš velké množství cholesterolu (nad jeho rozpustnost) vede k vypadávání cholesterolu a k vytvoření samostatných domén čistého krystalického cholesterolu, což vede k riziku vzniku nesoudržnosti lamelární struktury. Pro dosažení optimální bariérové kapacity, by tedy mělo být v lamelární struktuře co největší množství cholesterolu, ale nesmí přesáhnout jeho rozpustnost, což je okolo 30 mol%. Další in vitro vlastnosti cholesterolu, které by svědčily ve prospěch modelu jednotné gelové fáze, jsou jeho schopnost stabilizovat gelovou fázi a vytvářet směsi s různými typy lipidů.<sup>31, 32</sup>

Konečný teoretický model ještě stále není vytvořen a zůstávají nezodpovězeny klíčové otázky týkající se přesné struktury a uspořádání jednotlivých složek v intercelulárním prostoru stratum corneum.



Obr. 12 a) model jednotné gelové fáze, b) doménový-mozaikový model<sup>31</sup>

### 2.6.2 Vytvoření in vitro lipidového systému

Uměle vytvořené směsi lipidů, vyskytující se ve stratum corneum, se často používají jako modelové systémy, které svými vlastnostmi napodobují bariérovou funkci kůže. Své využití mají ve studiích, v nichž se zjišťuje vliv jednotlivých složek na fázové chování modelu.

Pro zjednodušení modelu lze využít syntetické ceramidy, čímž se eliminuje interindividuální variabilita živé tkáně. Bylo zjištěno, že i přes některé menší rozdíly, model vytvořený z umělých ceramidů má srovnatelné vlastnosti pozorované u stratum corneum.<sup>27</sup> Nezáleží totiž pouze na složení směsi, ale klíčovou roli hrají podmínky zvolené při přípravě vzorků.<sup>35</sup> Mezi nejdůležitější podmínky, které významně ovlivňují vytvořené modely stratum corneum, patří stav hydratace, teplota během níž jsou vzorky připravovány a pH.

## 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Pracovní úkol

V této rigorózní práci využíváme DSC k analýze jednotlivých složek intercelulárního prostoru rohové vrstvy. Abychom eliminovali interindividuální vlastnosti živé tkáně a mohli se tak zaměřit na úlohu jednotlivých složek, vytvořili jsme zjednodušené in vitro modely pomocí syntetického ceramidu, cholesterolu a kyseliny olejové.

Cílem této práce je nalézt nejvhodnější podmínky pro přípravu homogenních a hydratovaných směsí, dále vyhodnocení chování vzniklých směsí pomocí DSC a zachycení jejich makroskopického a mikroskopického vzhledu v průběhu jednotlivých cyklů hydratace.

Pracovní úkol můžeme rozdělit na několik následujících dílčích úkolů:

1. Stanovení DSC charakteristik cholesterolu
2. Stanovení DSC charakteristik syntetického ceramidu
3. Stanovení DSC charakteristik směsi cholesterolu a syntetického ceramidu
4. Stanovení DSC charakteristik směsi cholesterolu, syntetického ceramidu a kyseliny olejové
5. Makroskopický vzhled vzorků během jednotlivých cyklů hydratace
6. Mikroskopické preparáty

### 3.2 Seznam surovin

1. Cholesterol, minimum 99 %,Sigma – Aldrich chemie
2. Kyselina olejová, >98%, Fluca chemica
3. Syntetický ceramid 14S24, tetradecylester N-tetrakosanoyl-(L)-serinu
4. Přírodní ceramid N-acetyl-D- sphingosine, 98%,, Sigma
5. Ultra čistá voda (Millipore, USA)
6. Chloroform (stabilizovaný 1% ethylalkoholem), Penta
7. Metanol , Penta

### 3.3 Použité přístroje

#### 1. DSC 200 PC Phox<sup>®</sup>

Jedná se o diferenciální skenovací kalorimetr s tepelným tokem. Rozdíl energie dodané do vzorku a reference je měřen jako funkce teploty, vzorek a reference jsou podrobeny kontrolovanému teplotnímu programu.

- Výrobce ... Netzsch – Gerätebau, Německo
- Teplotní rozsah ... -150 °C – +600 °C
- Rychlost ohřevu ... 0,1 – 99,9 K/min
- Kalorimetrický rozsah ...  $\pm 750$  mW
- Kalorimetrická citlivost ... 4 – 4,5  $\mu$ V/mW (pro Indium)
- Chlazení ... tekutý dusík, Dewarova nádoba 26 l

#### 2. Vysokotlaké kelímky

- objem 27 $\mu$ l
- teplota max. 500°C
- vnitřní tlak max. 100 bar

#### 3. Ruční lis pro víčkování vysokotlakých kelímků

#### 4. Digitální analytické váhy Sartorius 2004 MP6

#### 5. Ultrazvuková lázeň, Sonorex super 10P digital, Bandelin

#### 6. Rotační vakuová odparka RVO- 64, Česká republika

#### 7. Třepačka VELP scientifica

#### 8. Světelný mikroskop Olympus BX51, software analySIS<sup>®</sup>

#### 9. Digitální fotoaparát Olympus C765 ULTRAZOOM

### 3.4 Postup práce

#### 3.4.1 Příprava vzorků pro měření na DSC

##### a) navážením vzorku do kelímku

- na analytických vahách zvážíme hmotnost prázdného kelímku
- na dno kelímku nanese malé množství vzorku 10 – 30 mg
- kelímek zavíčkuje pomocí ručního lisu
- kelímek opět zvážíme a vypočteme hmotnost navážky

##### b) příprava směsi na vakuové odparce

- do baňky s kulatým dnem navážíme na analytických vahách jednotlivé složky v určitém poměru
- složky v baňce rozpustíme ve směsi chloroformu a metanolu v poměru 2:1 (v/v)
- baňku se směsí umístíme na rotační vakuovou odparku a necháme odpařit směs rozpouštědel ( doba na odparce alespoň 20 min)
- baňku vložíme do exsikátoru s parafínem na 48 hodin ( jedenkrát exsikátor zavzdušníme a opět odvzdušníme )
- takto připravenou směs navážíme do viálky a podrobíme hydrataci

##### c) hydratace vzorku ultra čistou vodou s využitím ultrazvukové lázně

- hydrataci vzorku provádíme ve viálkách
- ke vzorku přikápneme pipetou ultra čistou vodu (95%, m/m)
- vzorek zahříváme na vodní lázni na teplotu maximálně 80°C po dobu 20 minut
- viálku umístíme do ultrazvukové lázně ( nastavení lázně: maximální teplota 70°C, skutečná teplota 65-69°C , síla 10 )
- ultrazvukovou lázeň zapneme na 2 minuty a to pětkrát během 20 minut
- viálku se vzorkem necháme stát při pokojové teplotě po dobu 20 minut
- po 6. a 12. cyklu ( jeden cyklus : 20 min vodní lázeň, 20 min ultrazvuková lázeň, 20 min stání při pokojové teplotě ) navážíme hydratovaný vzorek do kelímku viz. a)

##### d) hydratace vzorku ultra čistou vodou s využitím třepačky

- hydrataci vzorku provádíme ve viálkách
- ke vzorku přikápneme pipetou ultra čistou vodu (95%, m/m)
- vzorek zahříváme na vodní lázni na teplotu maximálně 80°C po dobu 20 minut
- viálku umístíme do třepačky a třepačku zapneme na 4 min, a to třikrát během 20 min
- viálku se vzorkem necháme stát při pokojové teplotě po dobu 20 minut



- po 6. a 12. cyklu ( jeden cyklus : 20 min vodní lázeň, 20 min třepačka, 20 min stání při pokojové teplotě ) navážíme hydratovaný vzorek do kelímku viz. a)

### 3.4.2 Příprava preparátů pro mikroskopii

#### a) hydratovaných vzorků připravených ve viálkách

- z viálky odebereme velmi malé množství vzorku a rovnoměrně jej rozetřeme na podložní sklíčko ( podložní sklíčko má ze spodní strany vyrytý orientační kříž )
- na vzorek přiložíme krycí sklíčko a jeho okraje natřeme lakem, abychom zabránili vyschnutí vody obsažené ve vzorku
- připravený preparát prohlédneme objektivem 10, používáme polarizační kroužek, provedeme záznam vybraného pole vzorku a označíme kvadrant a místo záznamu vzorku
- provedeme záznam stejného místa za použití objektivu 20

#### b) bezvodých vzorků

- odebereme velmi malé množství vzorku, zakápneme jej kapkou ultra čisté vody a rovnoměrně jej rozetřeme na podložní sklíčko ( podložní sklíčko má ze spodní strany vyrytý orientační kříž )
- na vzorek přiložíme krycí sklíčko a jeho okraje natřeme lakem, abychom zabránili vyschnutí vody
- připravený preparát prohlédneme objektivem 10, používáme polarizační kroužek, provedeme záznam vybraného pole vzorku a označíme kvadrant a místo záznamu vzorku
- provedeme záznam stejného místa za použití objektivu 20

### 3.4.3 Seznam vzorků a nastavení parametrů pro měření na DSC

Vzorek č.1

Cholesterol, navážka: 7,76 mg

Vzorek č.2

Cholesterol a ultra čistá voda po 6 cyklech na ultrazvukové lázni, navážka: 21,60 mg

Vzorek č.3

Cholesterol a ultra čistá voda po 12 cyklech na ultrazvukové lázni, navážka: 21,42 mg

Vzorek č.4

Cholesterol a ultra čistá voda po 6 cyklech na třepačce, navážka: 9,830 mg

Vzorek č.5

Syntetický ceramid, navážka: 1,99 mg

Vzorek č.6

Syntetický ceramid a ultra čistá voda po 6 cyklech na ultrazvukové lázni, navážka: 20,00 mg

Vzorek č.7

Syntetický ceramid a ultra čistá voda po 12 cyklech na ultrazvukové lázni, navážka: 10,91 mg

Vzorek č.8

Směs cholesterolu a syntetického ceramidu v poměru 1:1, navážka: 2,28 mg

Vzorek č.9

Směs cholesterolu, syntetického ceramidu v poměru 1:1 a ultra čisté vody po 6 cyklech na ultrazvukové lázni, navážka: 22,66 mg

Vzorek č.10

Směs cholesterolu, syntetického ceramidu v poměru 1:1 a ultra čisté vody po 12 cyklech na ultrazvukové lázni, navážka: 39,43 mg

Vzorek č.11

Směs cholesterolu, syntetického ceramidu v poměru 1:1 a ultra čisté vody po 6 cyklech na třepačce, navážka: 7,270 mg

Vzorek č.12

Směs cholesterolu a syntetického ceramidu v poměru 1:5, navážka: 3,18 mg

Vzorek č.13

Směs cholesterolu, syntetického ceramidu v poměru 1:5 a ultra čisté vody po 6 cyklech na ultrazvukové lázni, navážka: 17,10 mg

Vzorek č.14

Směs cholesterolu, syntetického ceramidu v poměru 1:5 a ultra čisté vody po 12 cyklech na ultrazvukové lázni, navážka: 13,66 mg

Vzorek č.15

Směs cholesterolu, syntetického ceramidu a kyseliny olejové v poměru 4:8:1, navážka: 1,89 mg

Vzorek č.16

Směs cholesterolu, syntetického ceramidu, kyseliny olejové v poměru 4:8:1 a ultra čisté vody po 6 cyklech na ultrazvukové lázni, navážka 38,55 mg

Vzorek č.17

Směs cholesterolu, syntetického ceramidu, kyseliny olejové v poměru 4:8:1 a ultra čisté vody po 6 cyklech na třepačce, navážka: 8,390 mg

Podmínky měření vzorků:

Vzorky č.1-17 byly změřeny za těchto podmínek

Fáze měření	Počáteční teplota [ °C ]	Konečná teplota [ °C ]	Rychlost ohřevu [°C/min ]	Rychlost chlazení [°C/min ]
chlazení na výchozí teplotu	-	5	-	10
izoterma	10 min			
1.ohřev	5	175	5	-
izoterma	5 min			
chlazení	175	5	-	10
izoterma	10 min			
2.ohřev	5	175	5	-

Vzorky č.3, 14 byly změřeny za těchto podmínek

Fáze měření	Počáteční teplota [ °C ]	Konečná teplota [ °C ]	Rychlost ohřevu [°C/min ]	Rychlost chlazení [°C/min ]
chlazení na výchozí teplotu	-	-60	-	10
izoterma	10 min			
1.ohřev	-60	190	5	-
izoterma	5 min			
chlazení	190	-60	-	10
izoterma	10 min			
2.ohřev	-60	180	5	-

Vzorek č.7 byl změřen za těchto podmínek

Fáze měření	Počáteční teplota [ °C ]	Konečná teplota [ °C ]	Rychlost ohřevu [°C/min ]	Rychlost chlazení [°C/min ]
chlazení na výchozí teplotu	-	-60	-	10
izoterma	10 min			
1.ohřev	-60	170	5	-
izoterma	5 min			
chlazení	170	-60	-	10
izoterma	10 min			
2.ohřev	-60	150	5	-

### 3.5 Výsledky experimentu

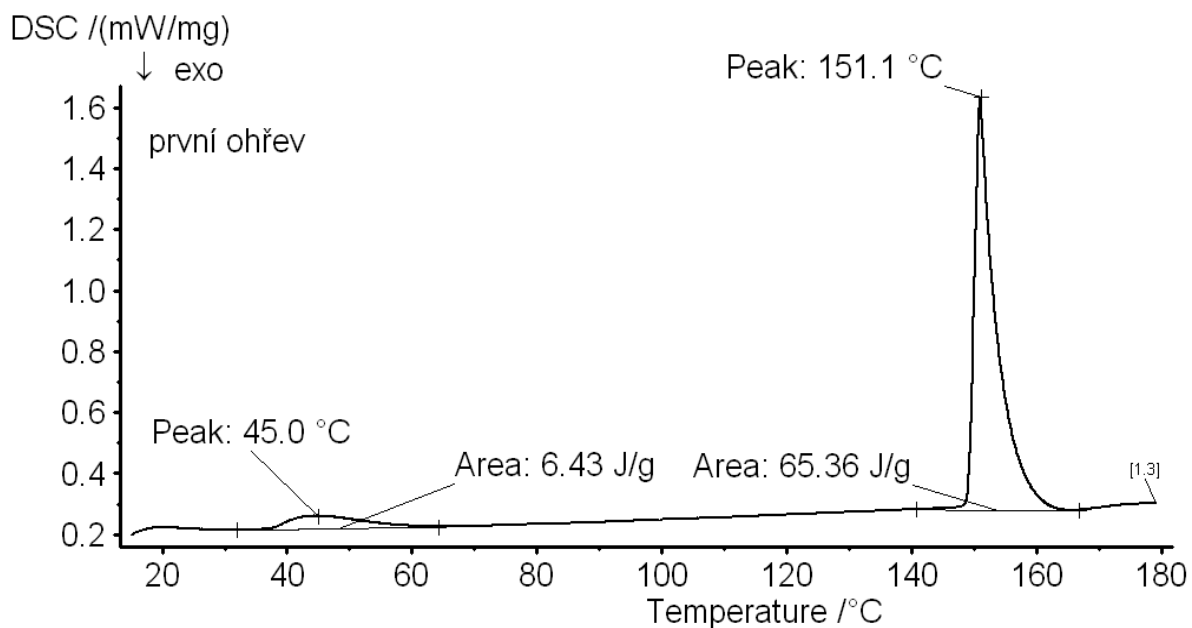
#### 3.5.1 Cholesterol, DSC

Graf č.1, vzorek č.1

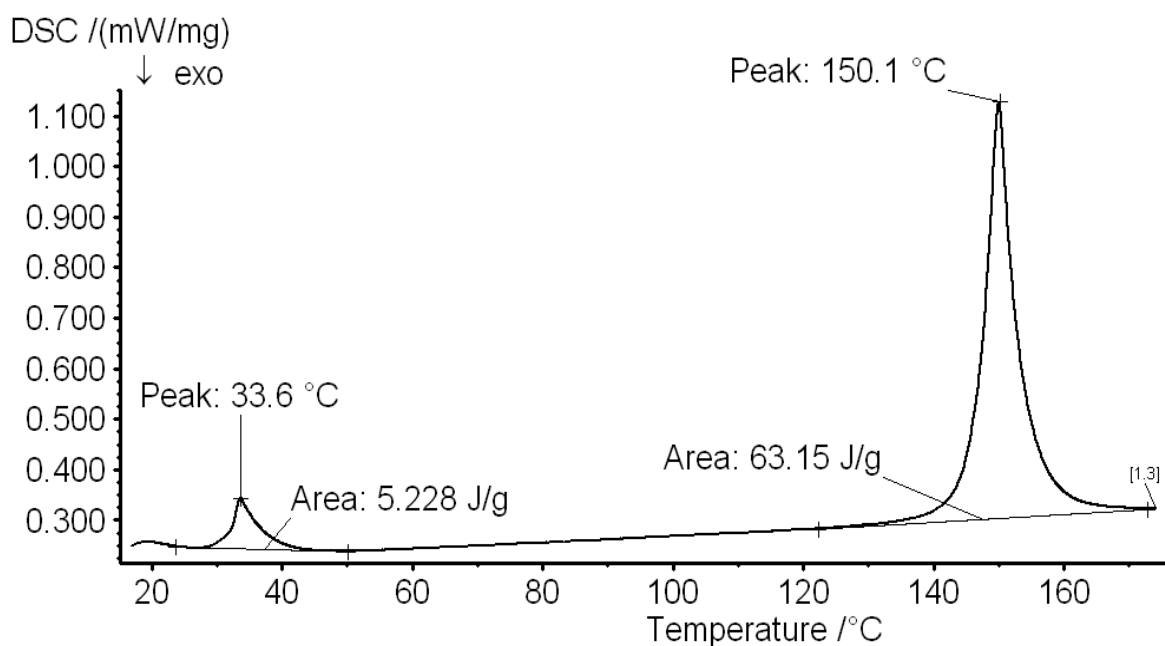
**Cholesterol**

Navážka: 7,76mg

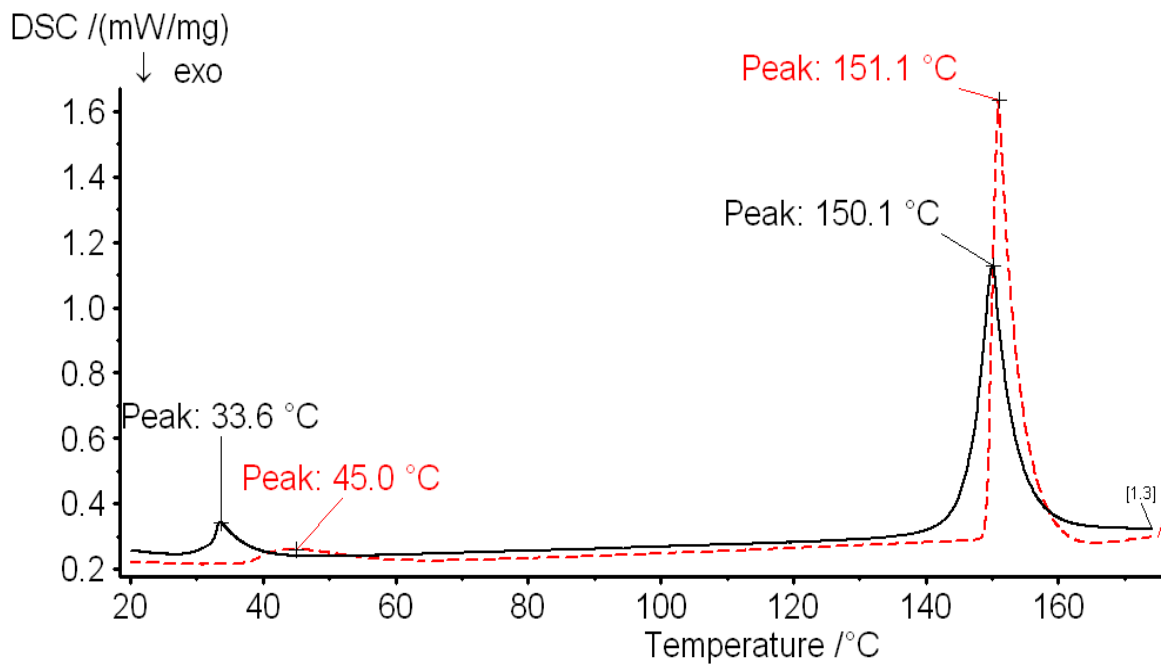
a) první ohřev



b) druhý ohřev



c) porovnání prvního a druhého ohřevu cholesterolu



přerušovaná čára ... první ohřev

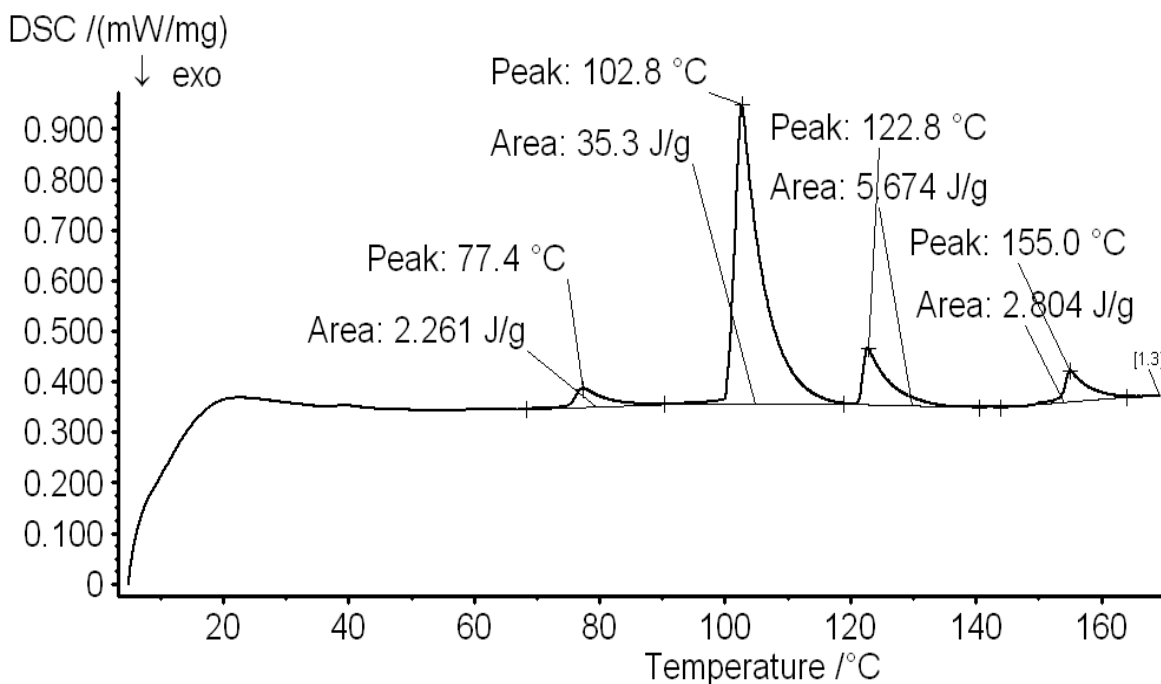
plná čára ... druhý ohřev

Graf č.2, vzorek č.2

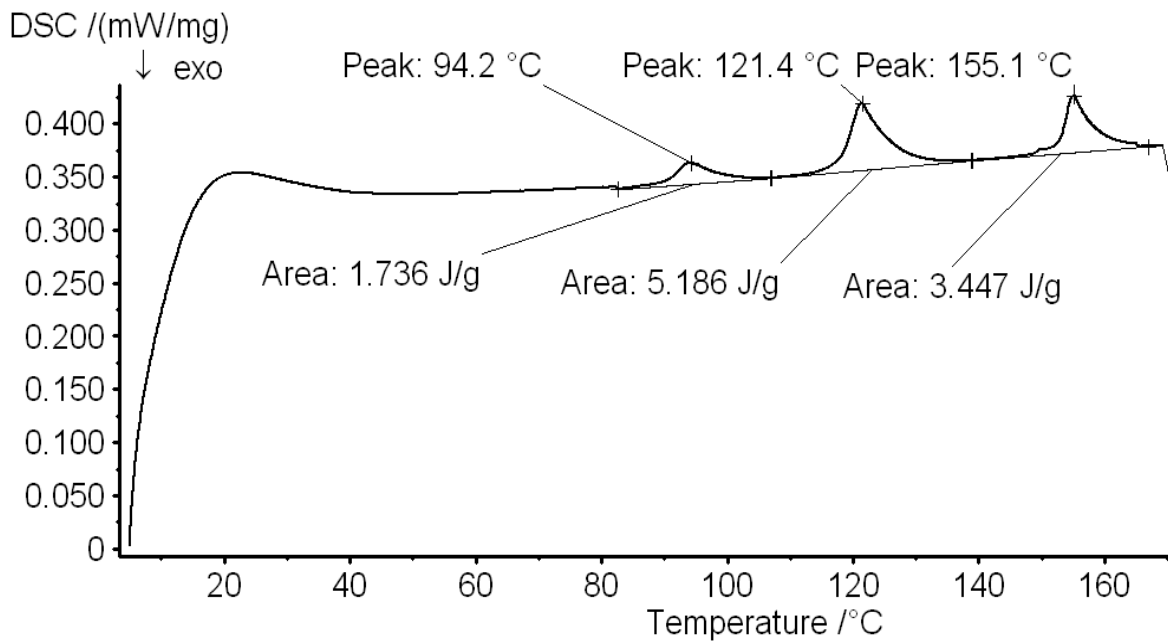
**Cholesterol a ultra čistá voda po 6 cyklech na ultrazvukové lázni**

Navážka: 21,60mg

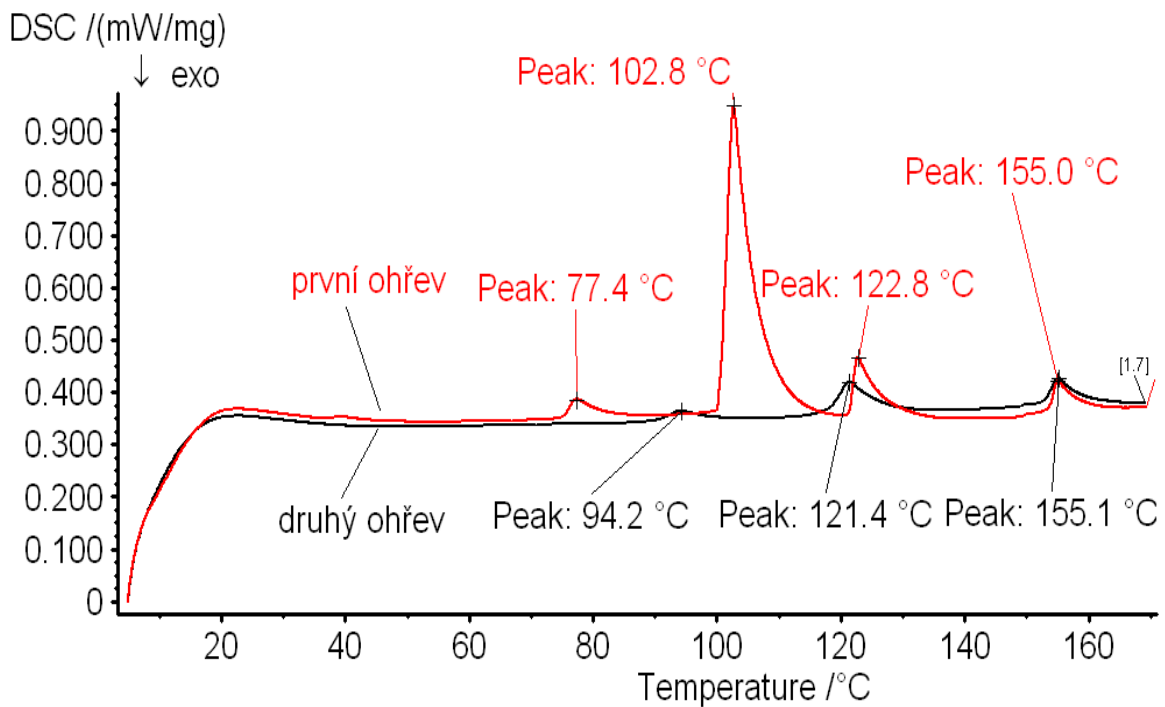
a) první ohřev



b) druhý ohřev



c) porovnání prvního a druhého ohřevu

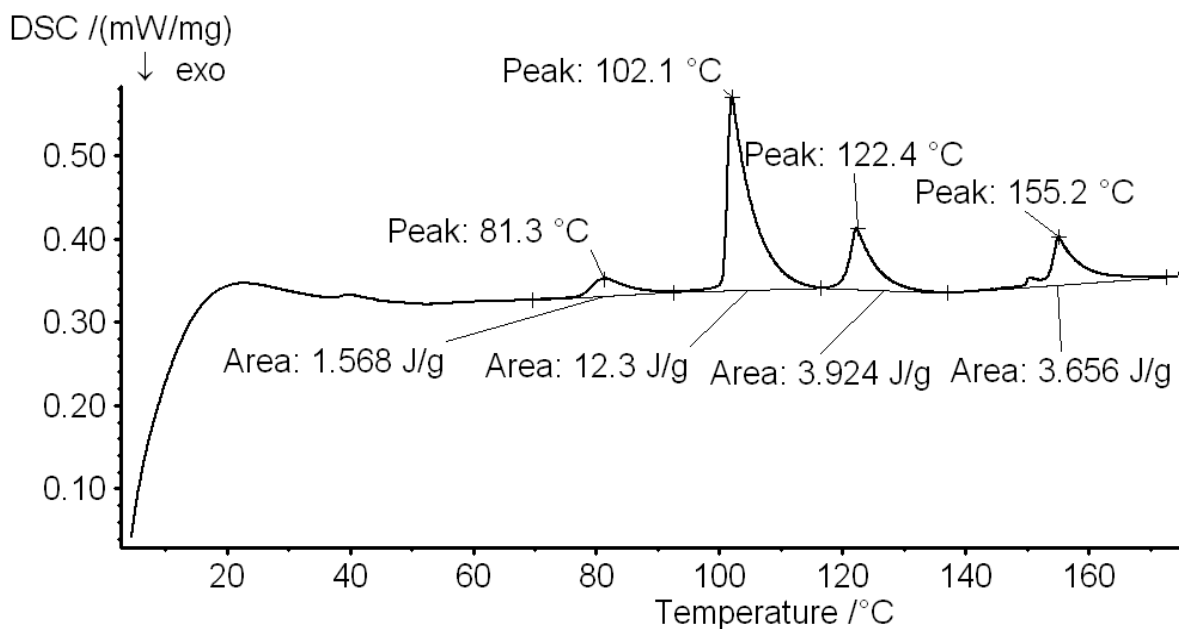


Graf č.3, vzorek č.3

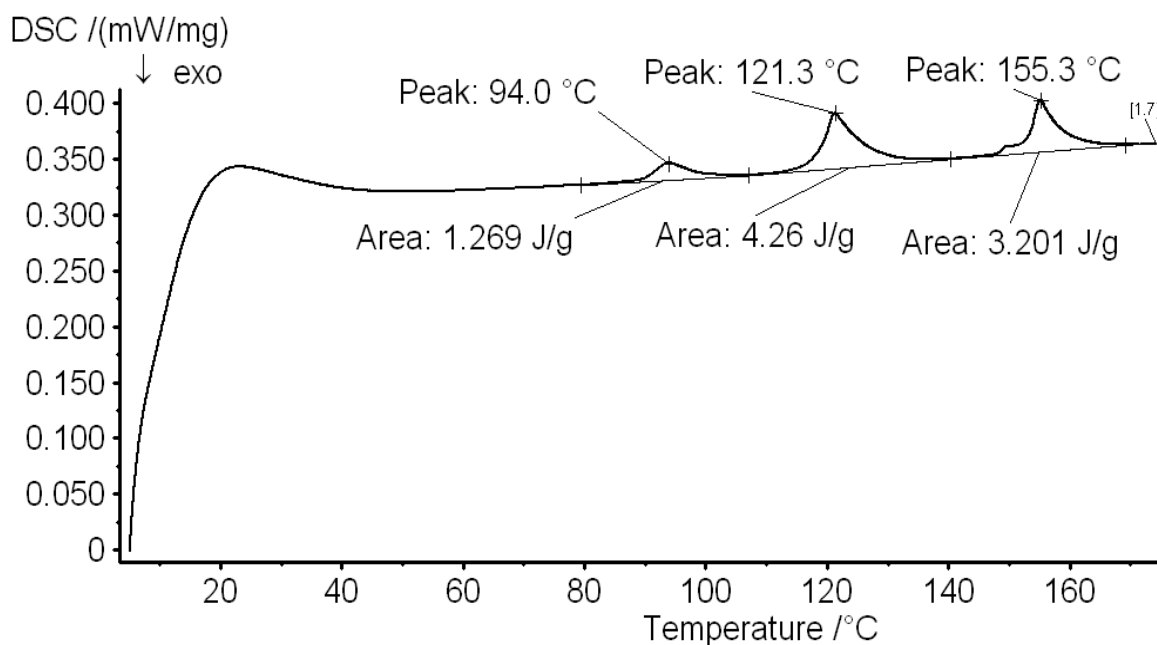
### Cholesterol a ultra čistá voda po 12 cyklech na ultrazvukové lázni

Navážka: 21,42mg

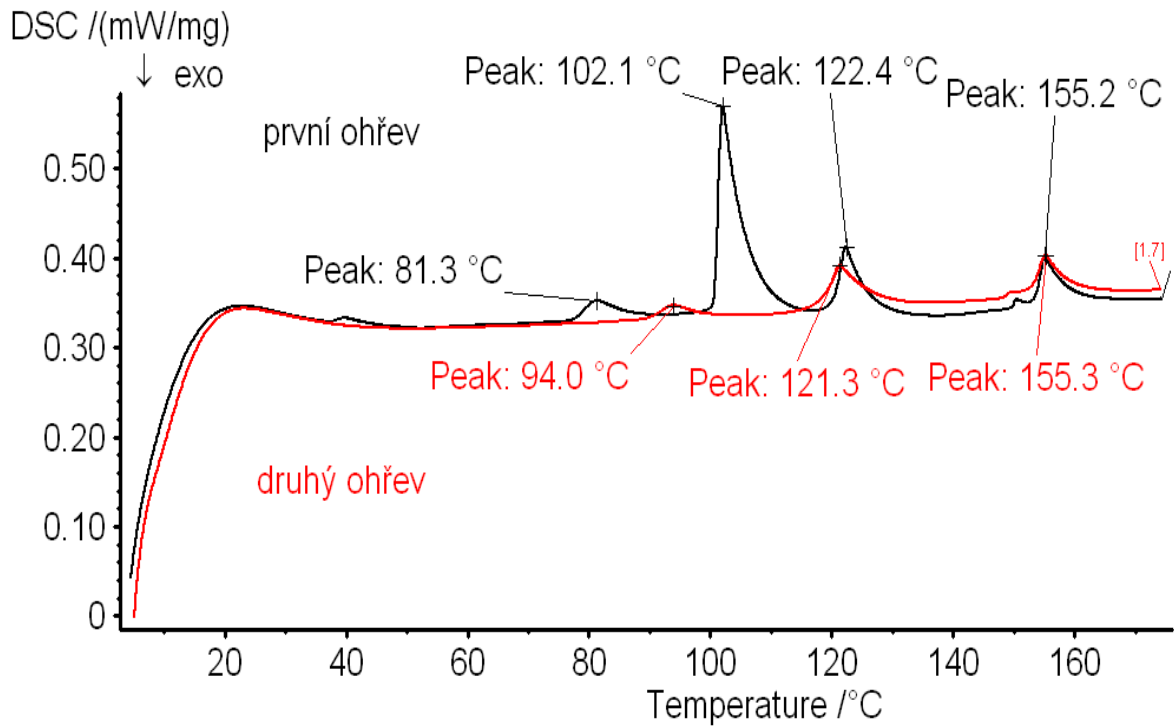
a) první ohřev



b) druhý ohřev

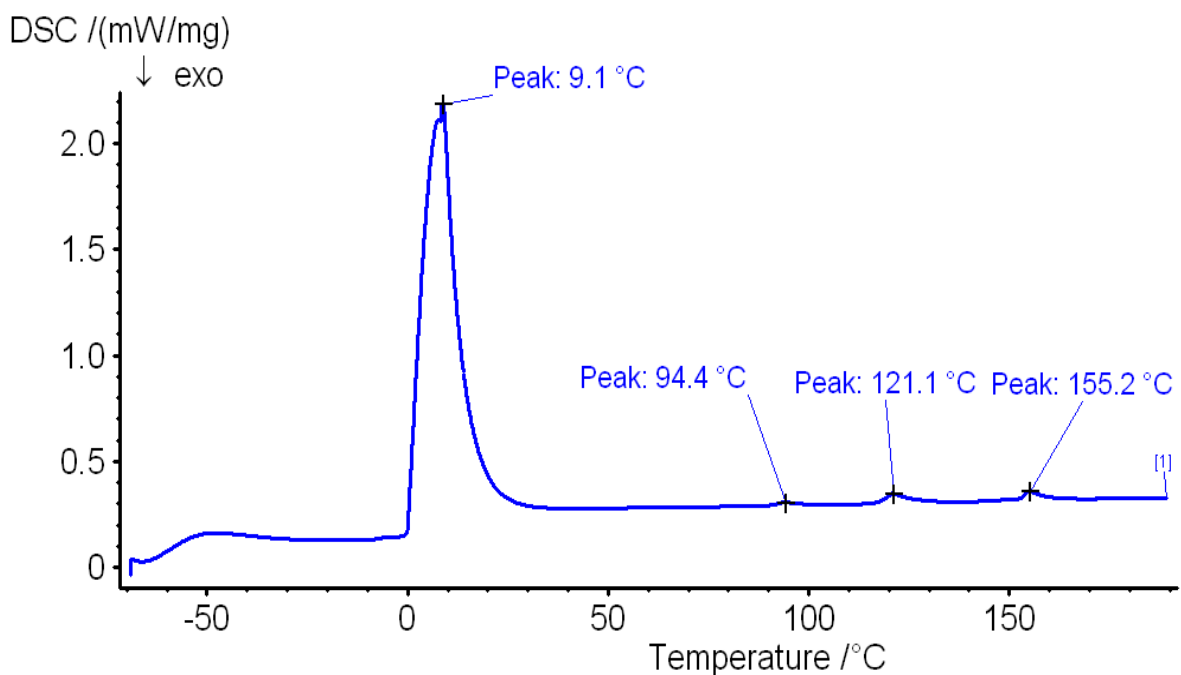


c) porovnání prvního a druhého ohřevu



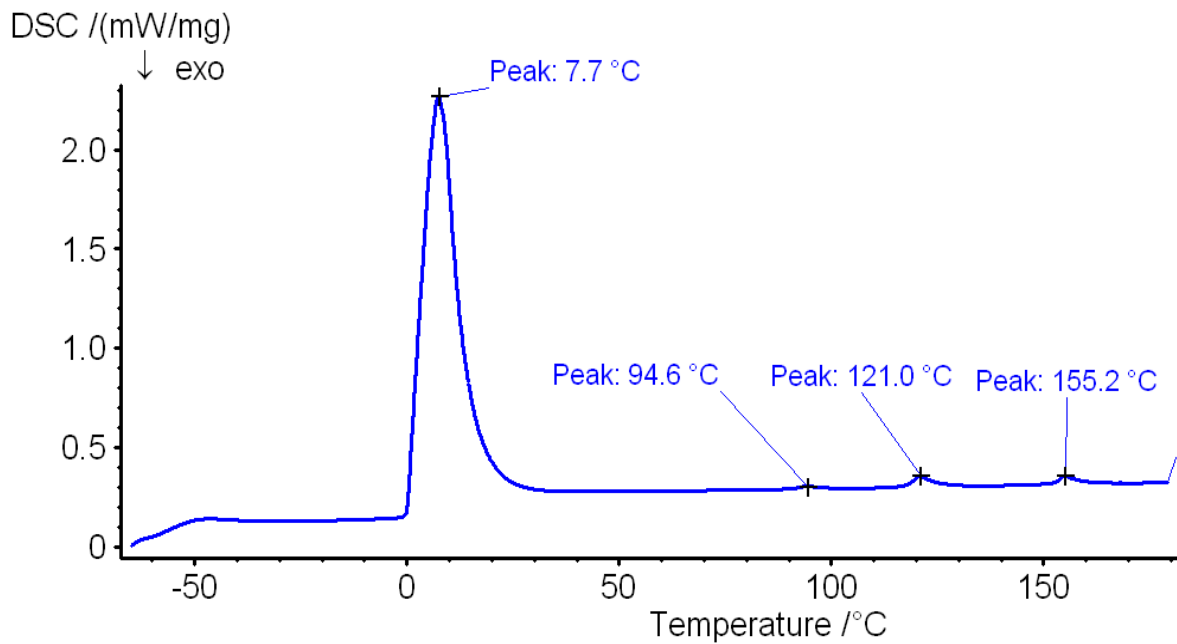
d) opakování měření vzorku č.3 po cca 5 měsících stání v kelímku, měření s chlazením na výchozí teplotu -60°C

první ohřev



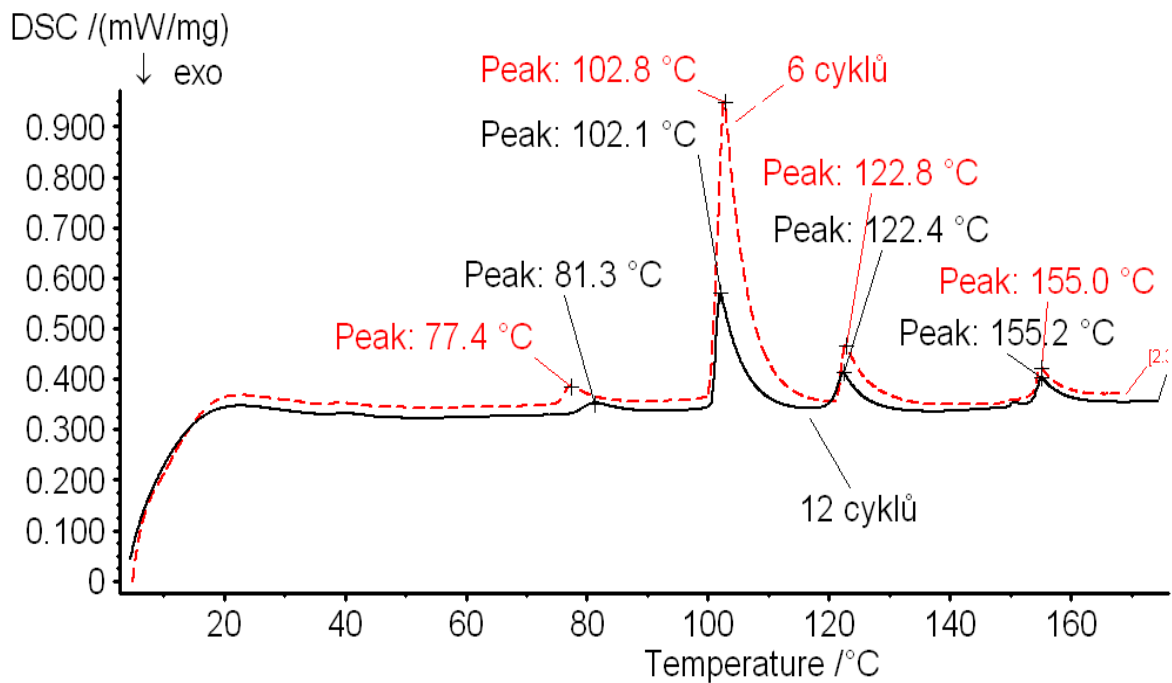


druhý ohřev

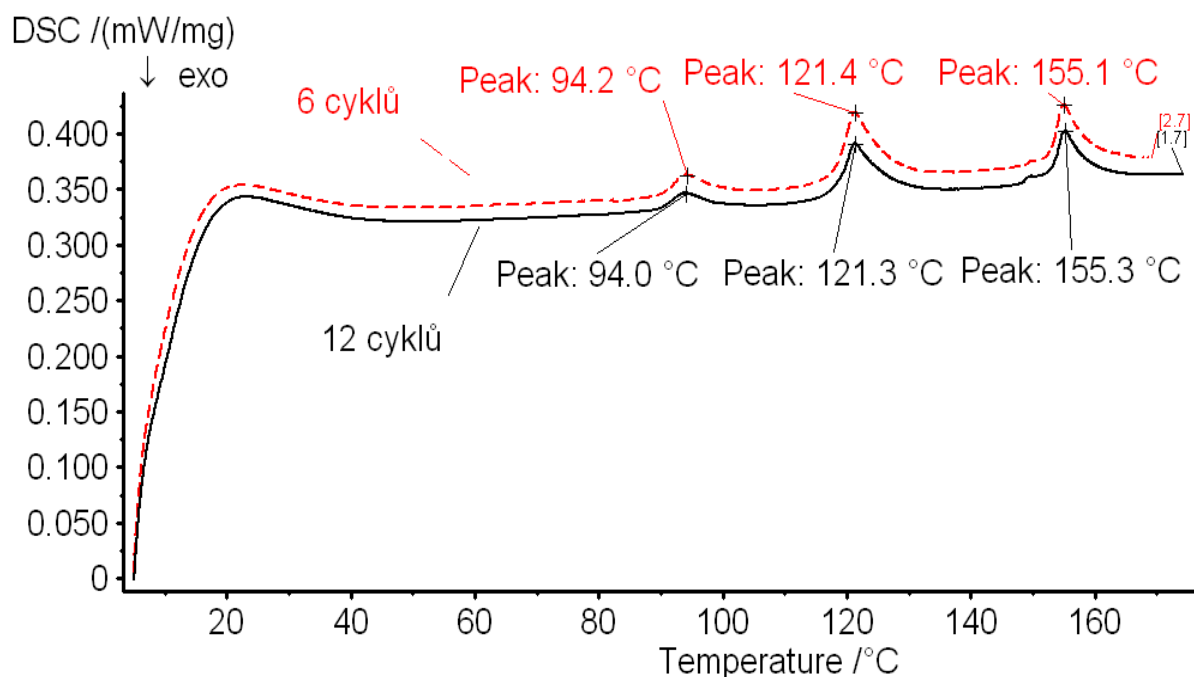


e) porovnání vzorku cholesterolu a ultra čisté vody po 6 a 12 cyklech na ultrazvukové lázni

první ohřev



druhý ohřev

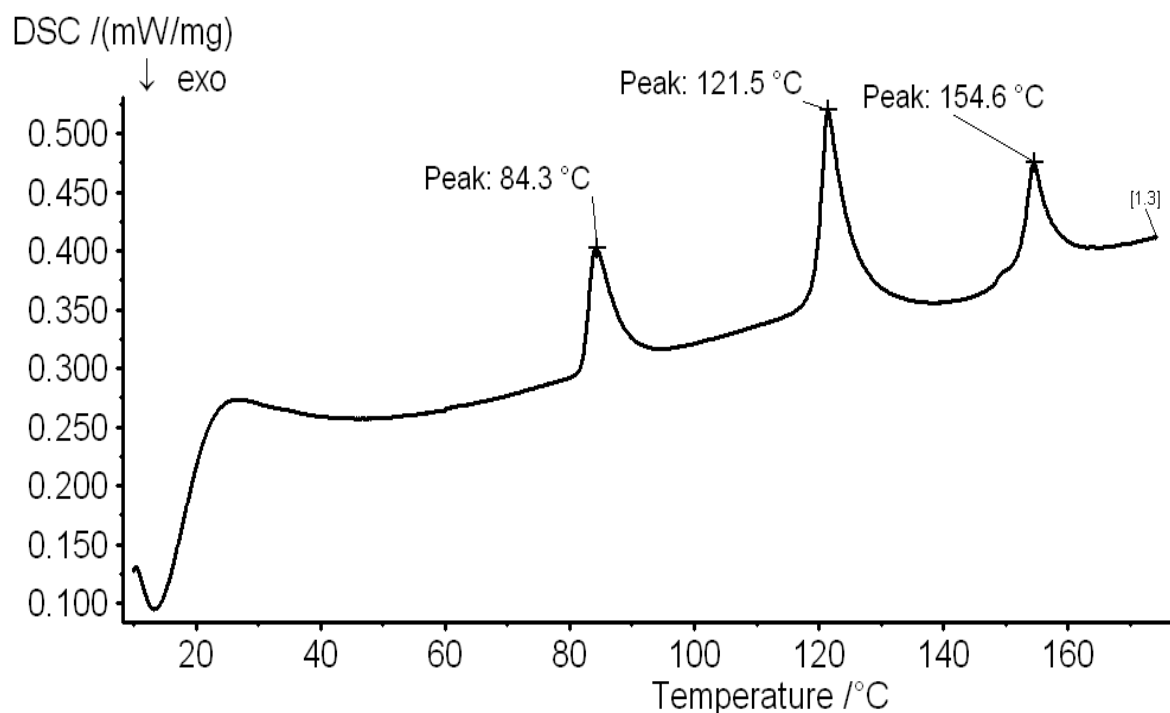


Graf č.4, vzorek č.4

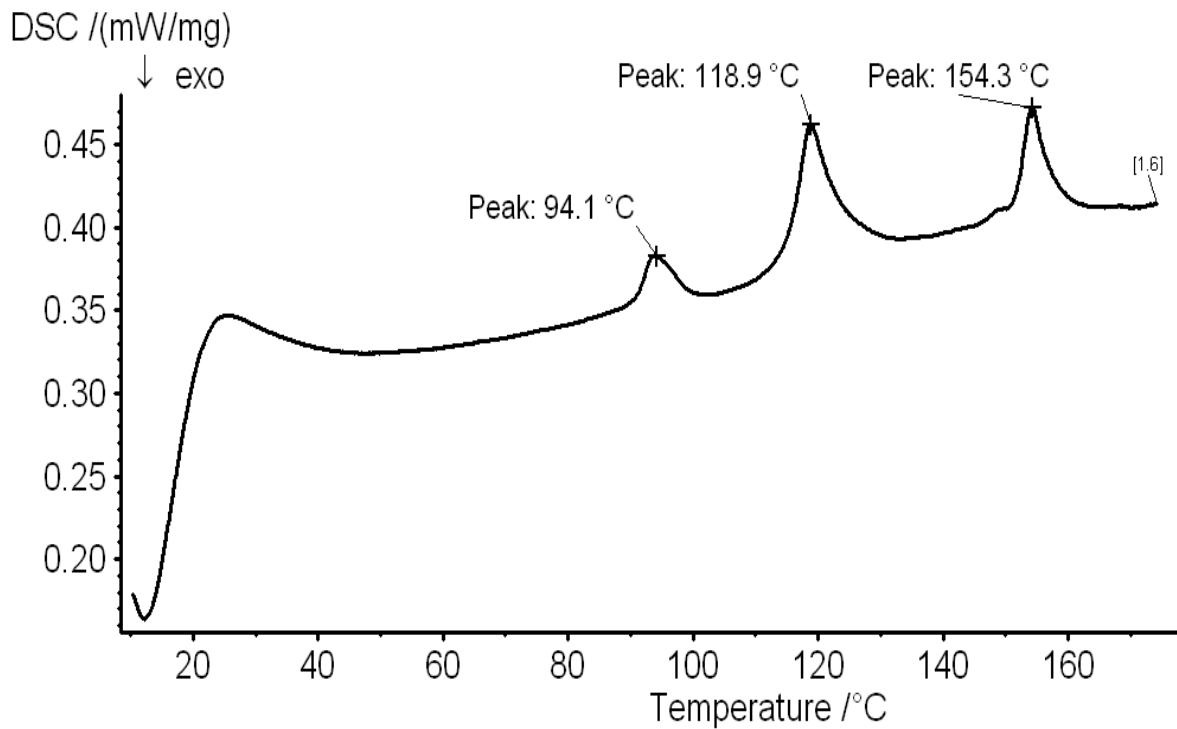
**Cholesterol a ultra čistá voda po 6 cyklech na třepače, změřeno po cca 11 měsících stání ve víalce při pokojové teplotě**

Navážka: 9,830 mg

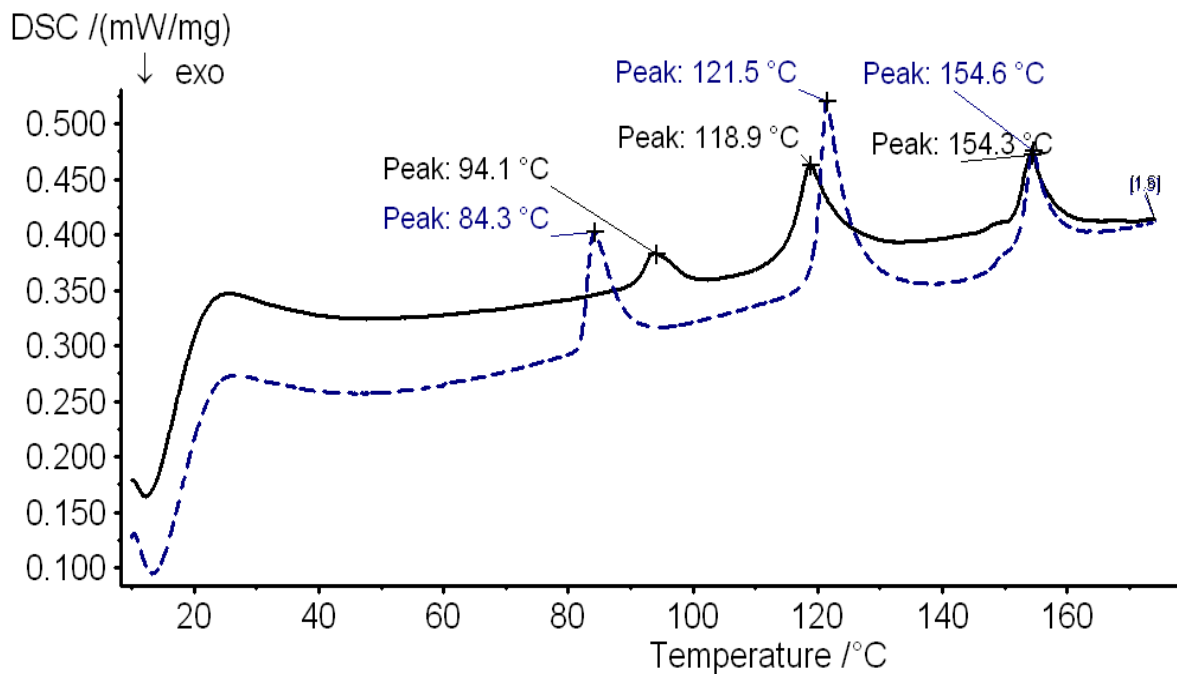
a) první ohřev



b) druhý ohřev



c) porovnání prvního a druhého ohřevu



přerušovaná čára ... první ohřev

plná čára ... druhý ohřev

Tabulka č.1

**Teploty tání vzorků cholesterolu, cholesterolu s ultra čistou vodou po 6 a 12 cyklech na ultrazvukové lázni a cholesterolu s ultra čistou vodou po 6 cyklech na třepačce**

Vzorky	Teplota tání [°C]								
	1.ohřev					2.ohřev			
	cholesterol	45,0	-	-	-	151,1	33,6	-	-
cholesterol, voda (6cyklů, ultrazvuk.lázeň)	-	77,4	102,8	122,8	155,0	-	94,5	120,3	154,9
cholesterol, voda (12cyklů, ultrazvuk.lázeň)	-	81,3	102,2	122,4	152,1	-	94,0	121,3	155,3
cholesterol, voda (6cyklů, třepačka)	-	-	84,3	121,5	154,6	-	94,1	118,9	154,3

Tabulka č.2

**Tepla tání vzorků cholesterolu, cholesterolu s ultra čistou vodou po 6 a 12 cyklech na ultrazvukové lázni a cholesterolu s ultra čistou vodou po 6 cyklech na třepačce**

Vzorky	Tepla tání [ J/g ]								
	1.ohřev					2.ohřev			
	cholesterol	6,43	-	-	-	65,36	5,22	-	-
cholesterol, voda (6cyklů, ultrazvuk.lázeň)	-	2,261	35,300	5,674	2,804	-	1,736	5,186	3,447
cholesterol, voda (12cyklů, ultrazvuk.lázeň)	-	1,568	12,300	3,924	3,656	-	1,269	4,260	3,201
cholesterol, voda (6cyklů, třepačka)	-	-	6,385	12,930	4,996	-	2,104	8,376	4,456

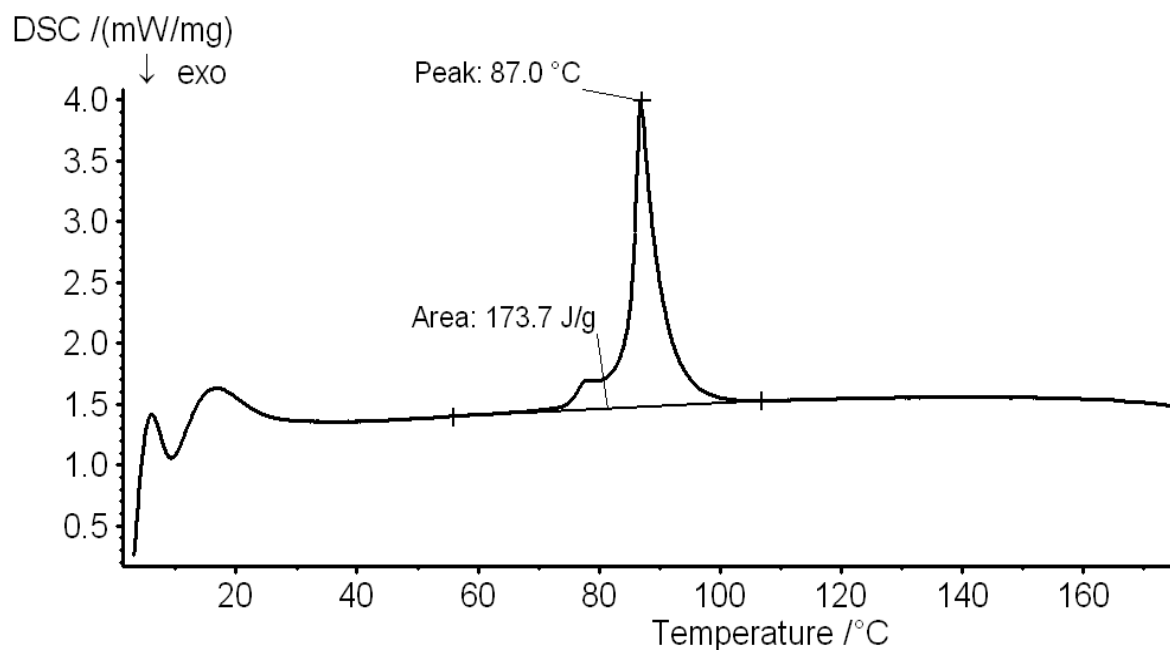
### 3.5.2 Syntetický ceramid, DSC

Graf č.5, vzorek č.5

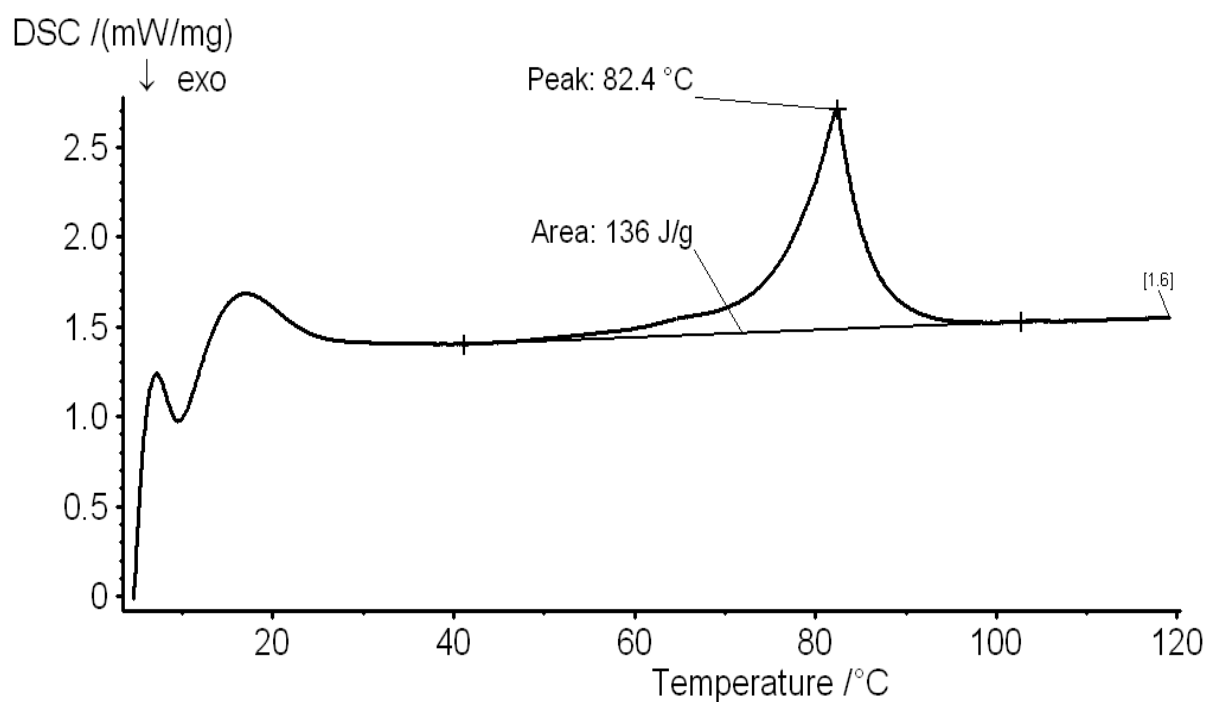
**Syntetický ceramid**

Navážka: 1,99 mg

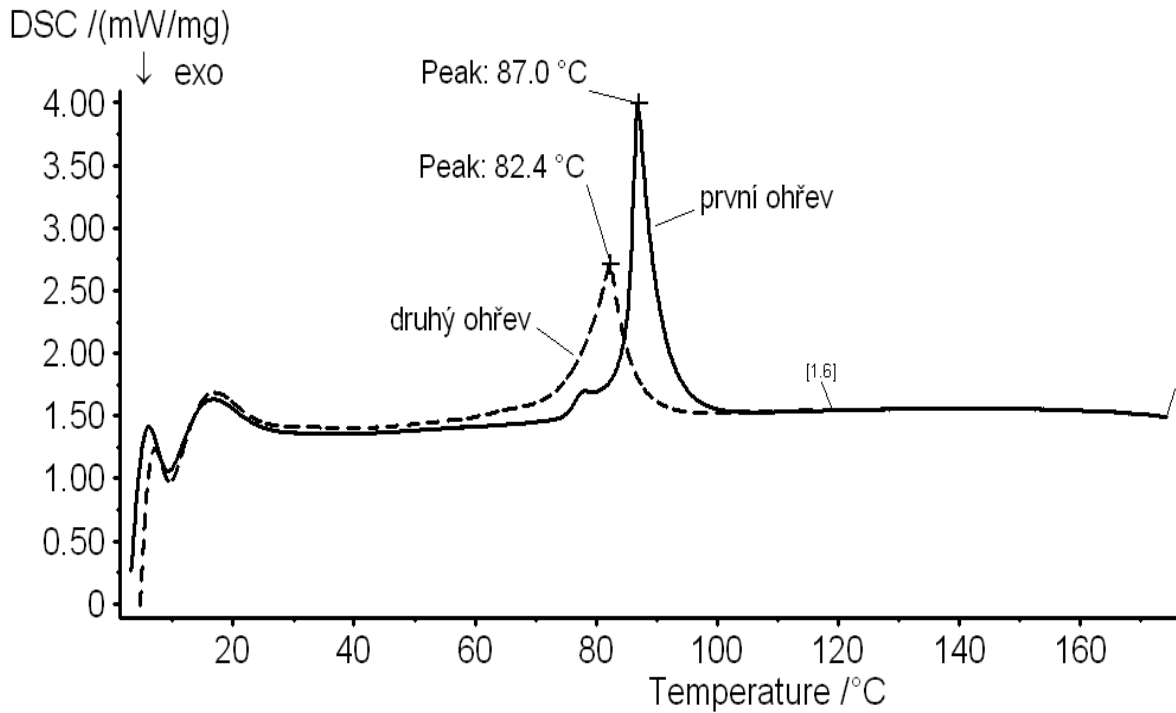
a) první ohřev



b) druhý ohřev



c) porovnání prvního a druhého ohřevu

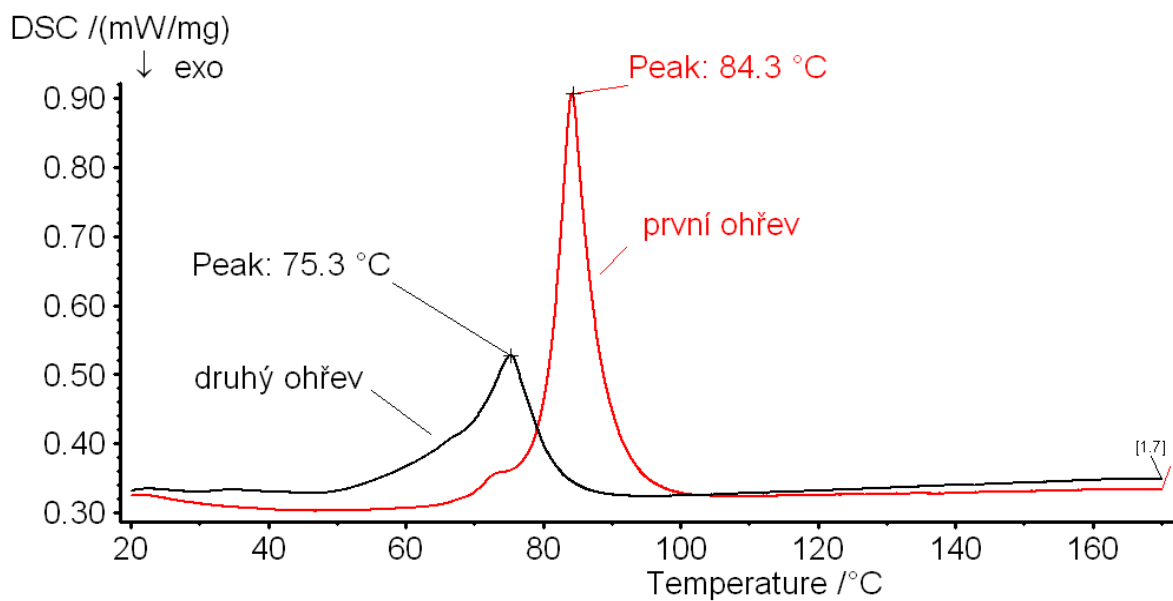


Graf č.6, vzorek č.6

**Syntetický ceramid s ultra čistou vodou po 6 cyklech na ultrazvukové lázni**

Navážka: 20,00 mg

porovnání prvního a druhého ohřevu

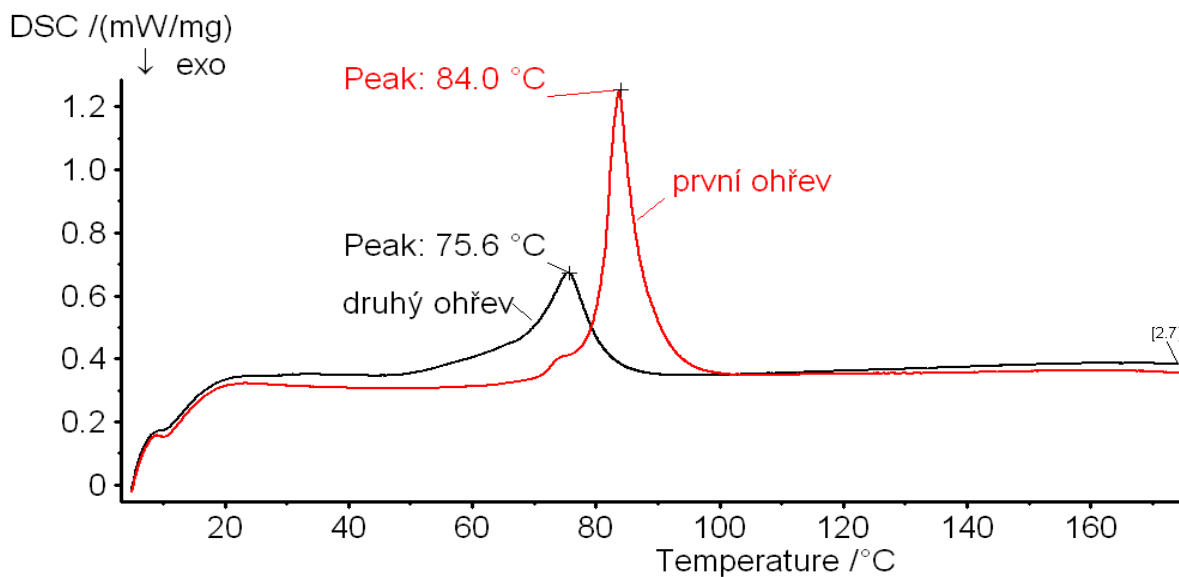


Graf č.7, vzorek č.7

**Syntetický keramid s ultra čistou vodou po 12 cyklech na ultrazvukové lázni**

Navážka: 10,91mg

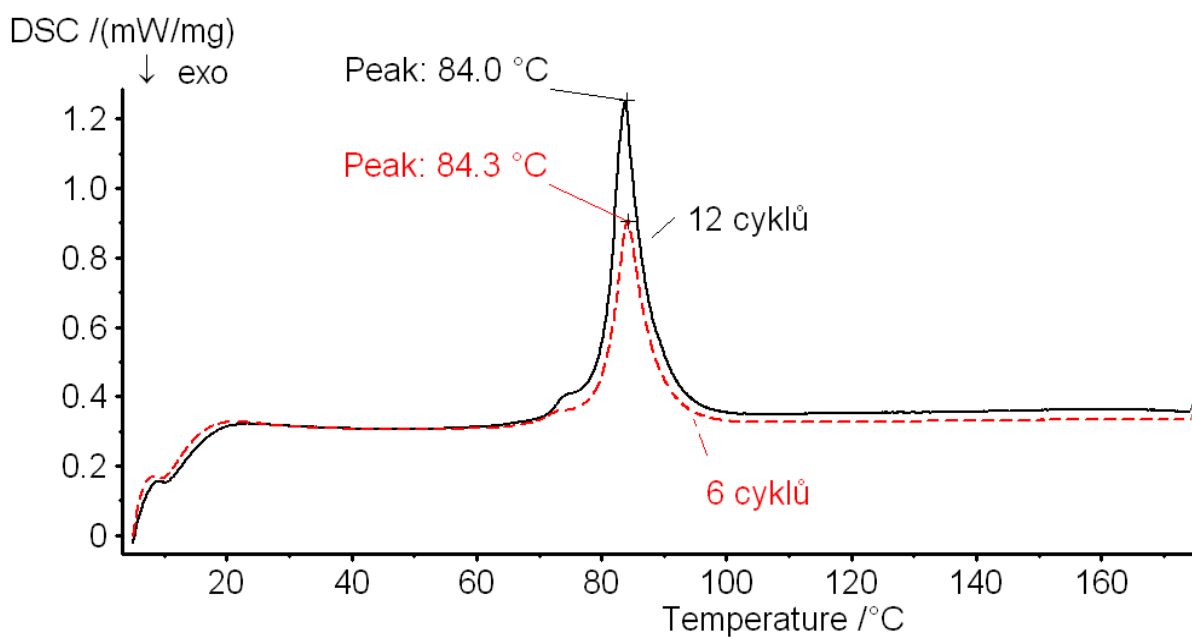
porovnání prvního a druhého ohřevu



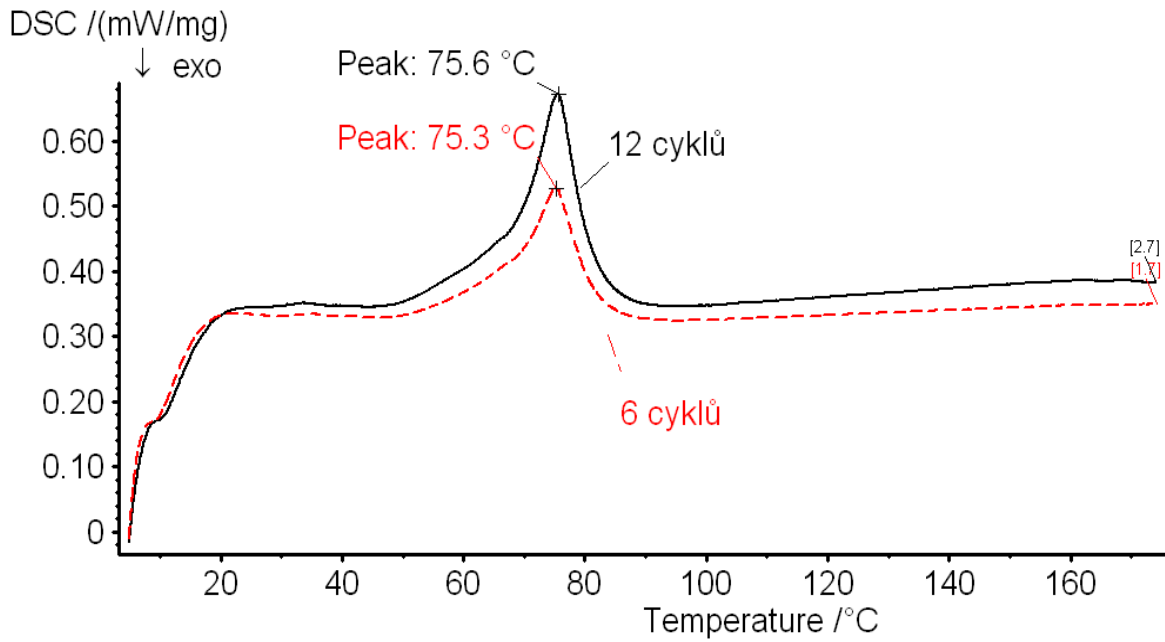
Graf č.8

Porovnání vzorků syntetického keramidu s ultra čistou vodou po 6 a 12 cyklech hydratace na ultrazvukové lázni

a) první ohřev



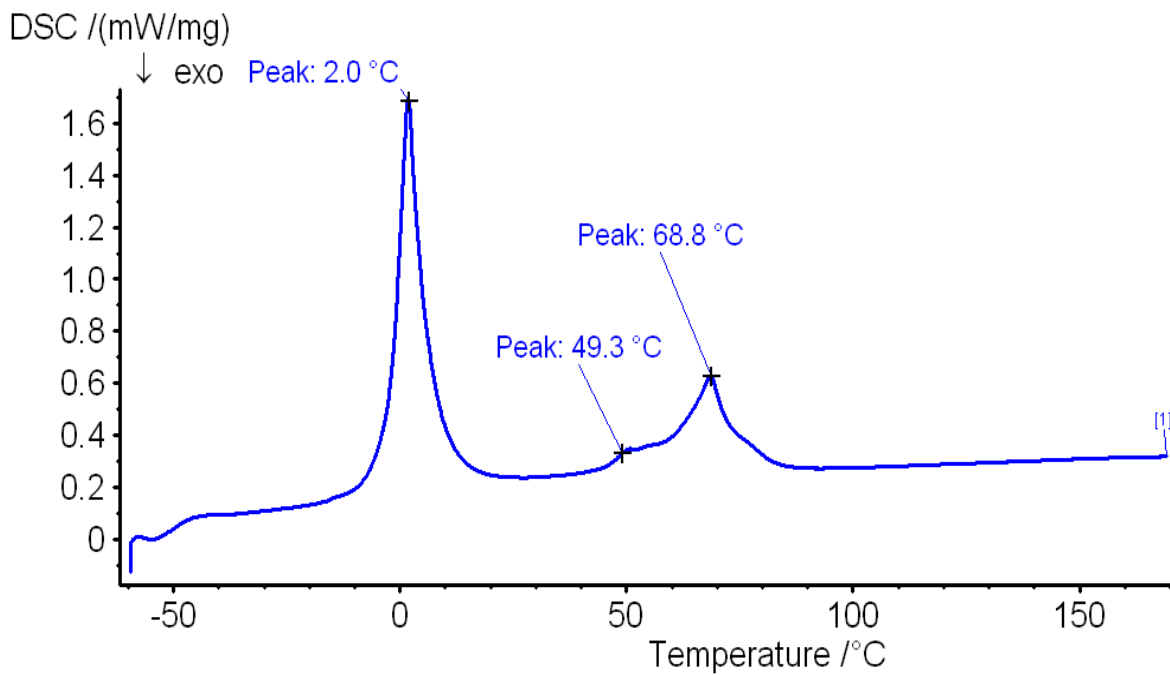
b) druhý ohřev



Graf č.9

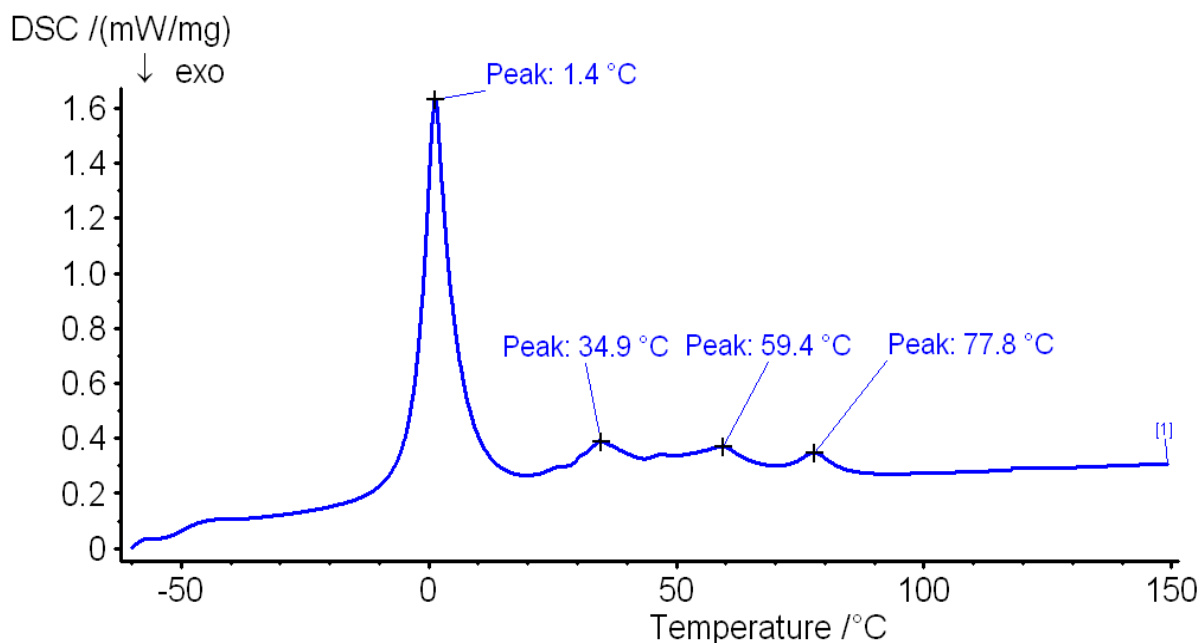
Opakování měření vzorku č.7 po cca 5 měsících stání v kelímku, měření s chlazením na výchozí teplotu -60°C

a) první ohřev





b) druhý ohřev



Tabulka č.3

**Teploty a tepla tání vzorků syntetického ceramidu, syntetického ceramidu s ultra čistou vodou po 6 a 12 cyklech na ultrazvukové lázni**

Vzorky	Teplota tání [°C ]		Teplota tání [ J/g ]	
	1. ohřev	2. ohřev	1. ohřev	2. ohřev
Syntetický ceramid	87,0	82,4	173,7	136,0
Synt. ceramid, voda ( 6cyklů, ultrazvuk.lázeň)	84,3	75,3	52,75	31,17
Synt. ceramid, voda ( 12 cyklů, ultrazvuk.lázeň)	84,0	75,6	79,22	46,55

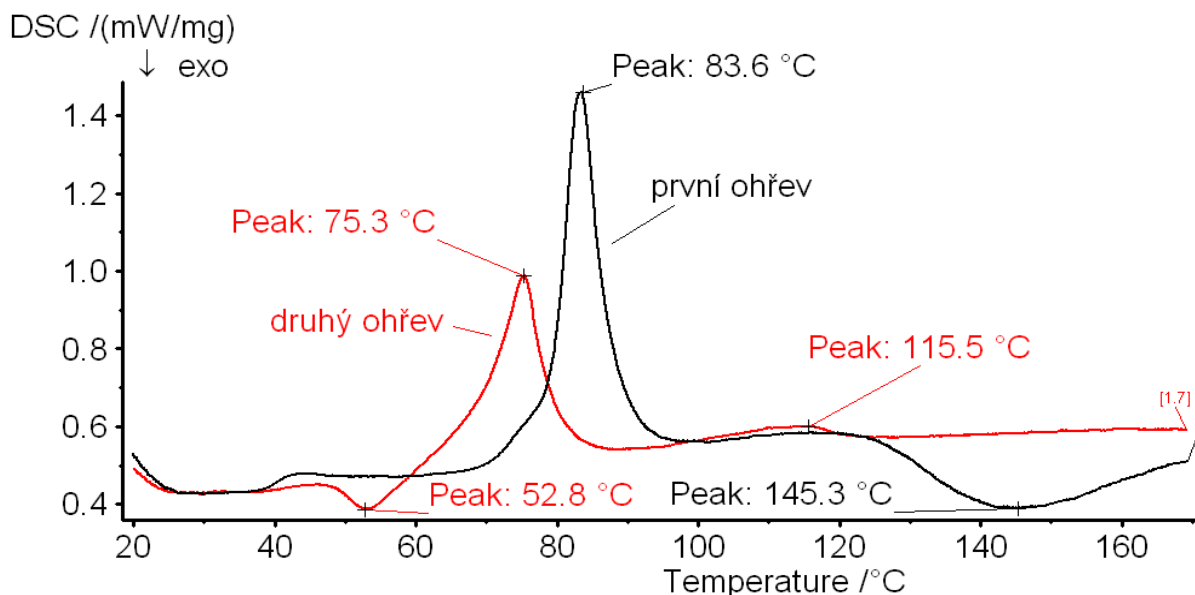
### 3.5.3 Směs cholesterolu a syntetického ceramidu, DSC

Graf č.10, vzorek č.8

#### Směs cholesterolu a syntetického ceramidu v poměru 1:1

Navážka: 2,48 mg

Porovnání prvního a druhého ohřevu

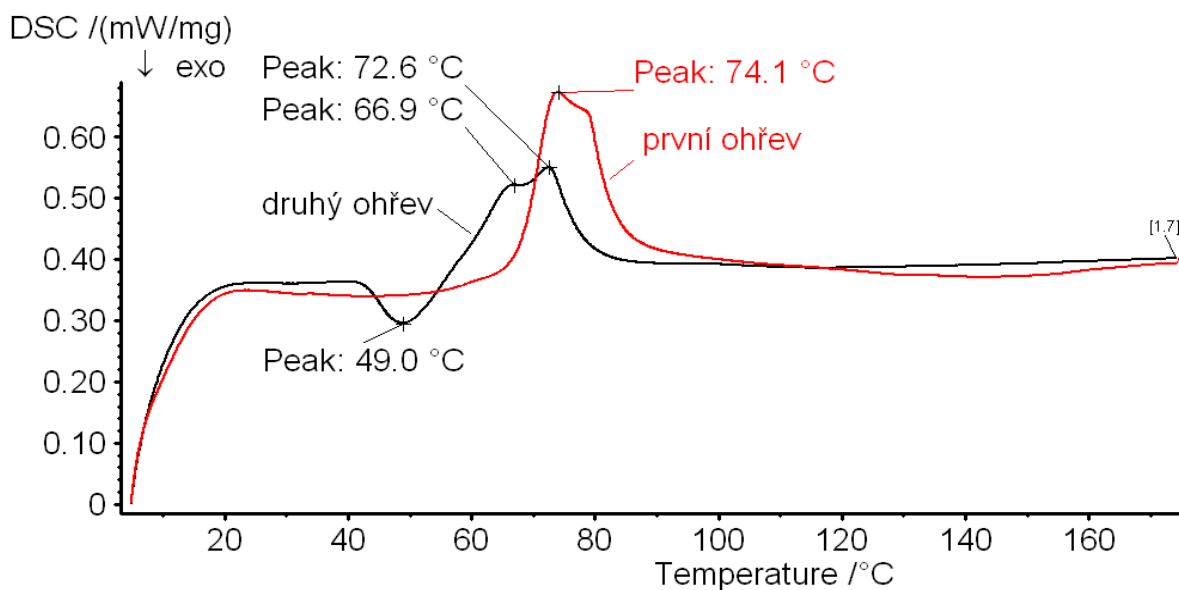


Graf č.11, vzorek č.9

#### Směs cholesterolu, syntetického ceramidu v poměru 1:1 a ultra čisté vody po 6 cyklech na ultrazvukové lázni

Navážka: 22,66 mg

Porovnání prvního a druhého ohřevu

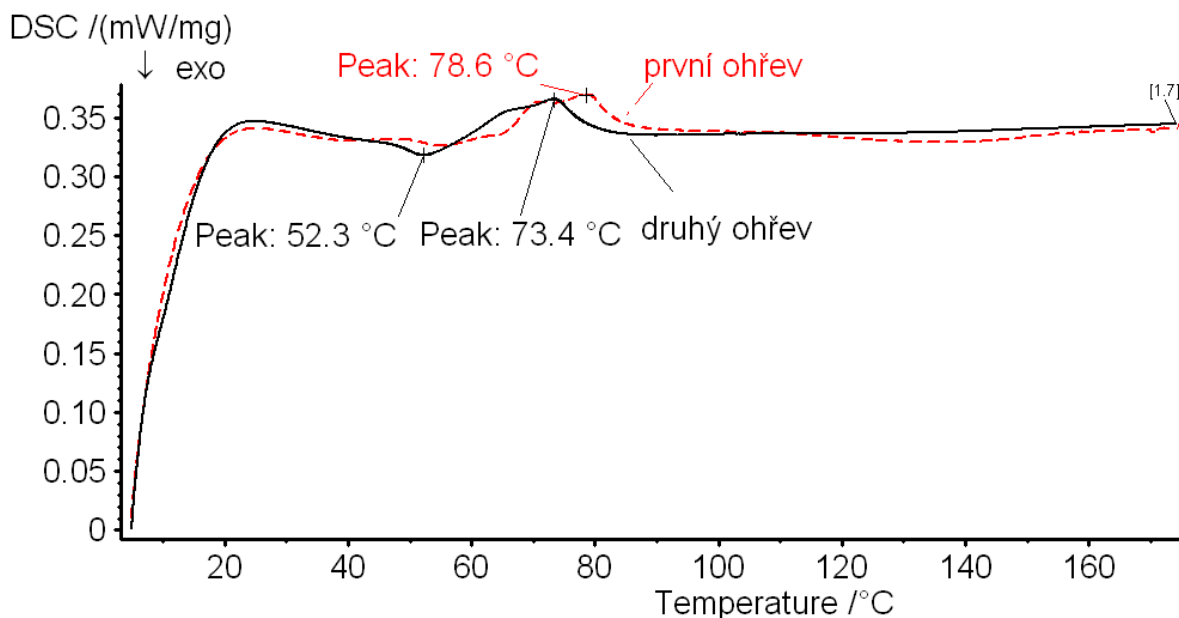


Graf č.12, vzorek č.10

**Směs cholesterolu, syntetického ceramidu v poměru 1:1 a ultra čisté vody po 12 cyklech na ultrazvukové lázni**

Navážka: 39,43 mg

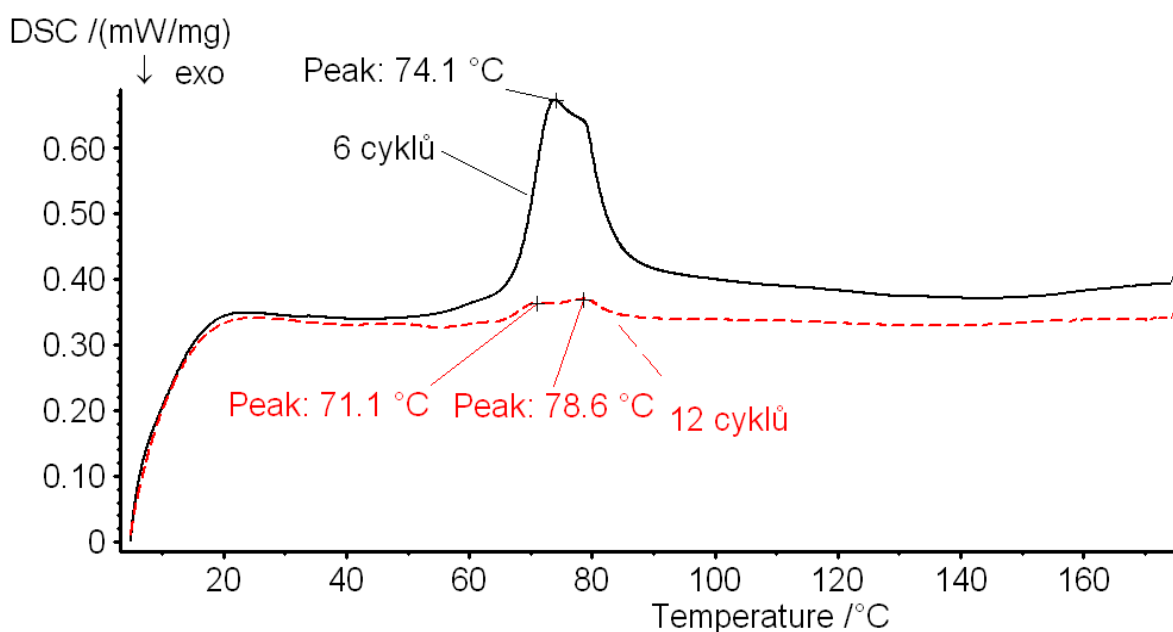
Porovnání prvního a druhého ohřevu



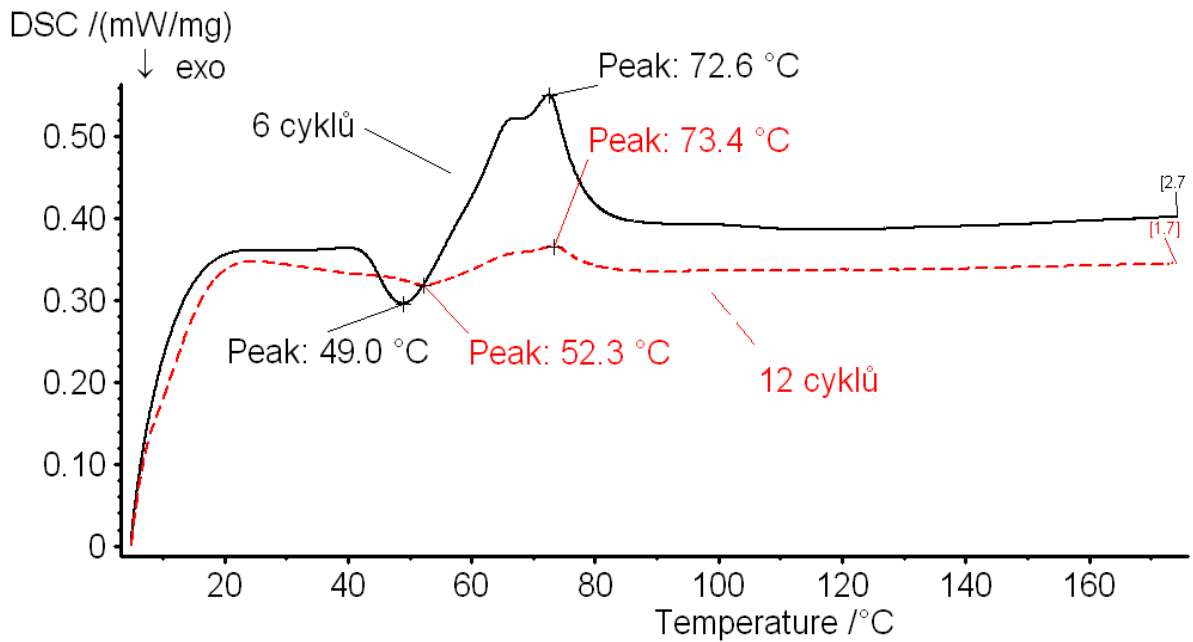
Graf č.13

**Porovnání vzorků cholesterolu, syntetického ceramidu v poměru 1:1 a ultra čisté vody po 6 a 12 cyklech na ultrazvukové lázni**

a) první ohřev



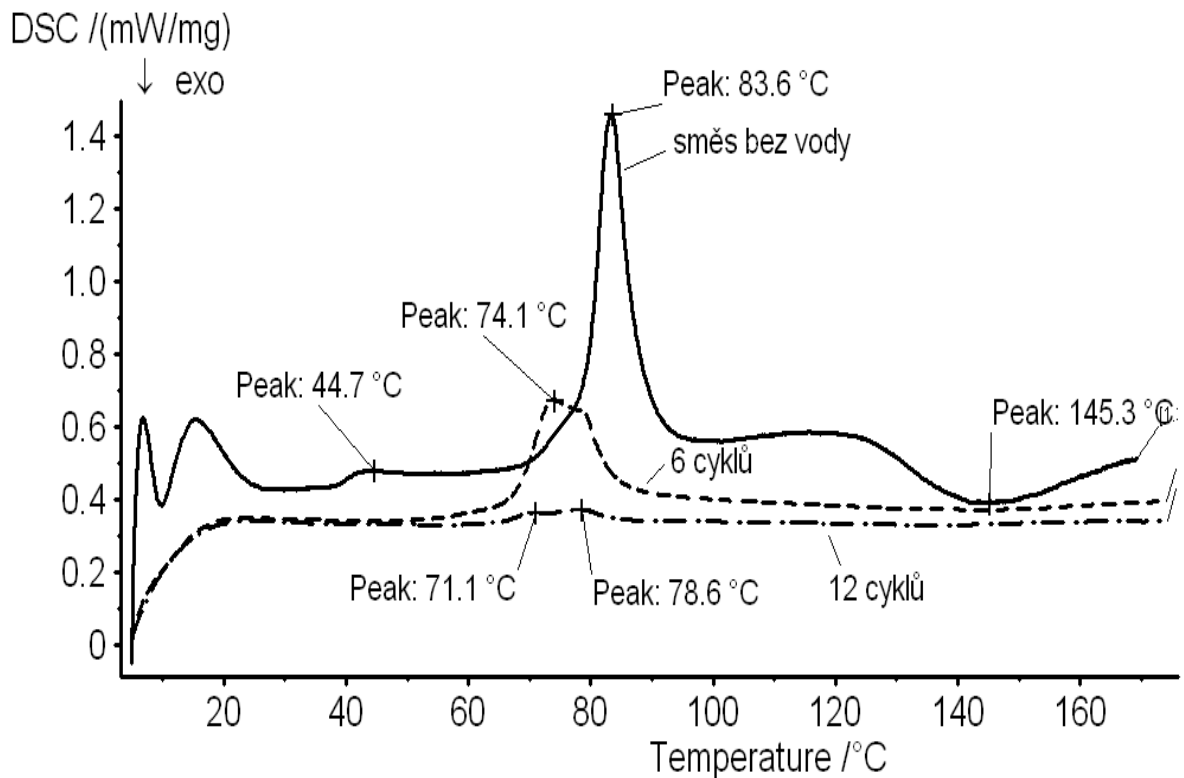
b) druhý ohřev



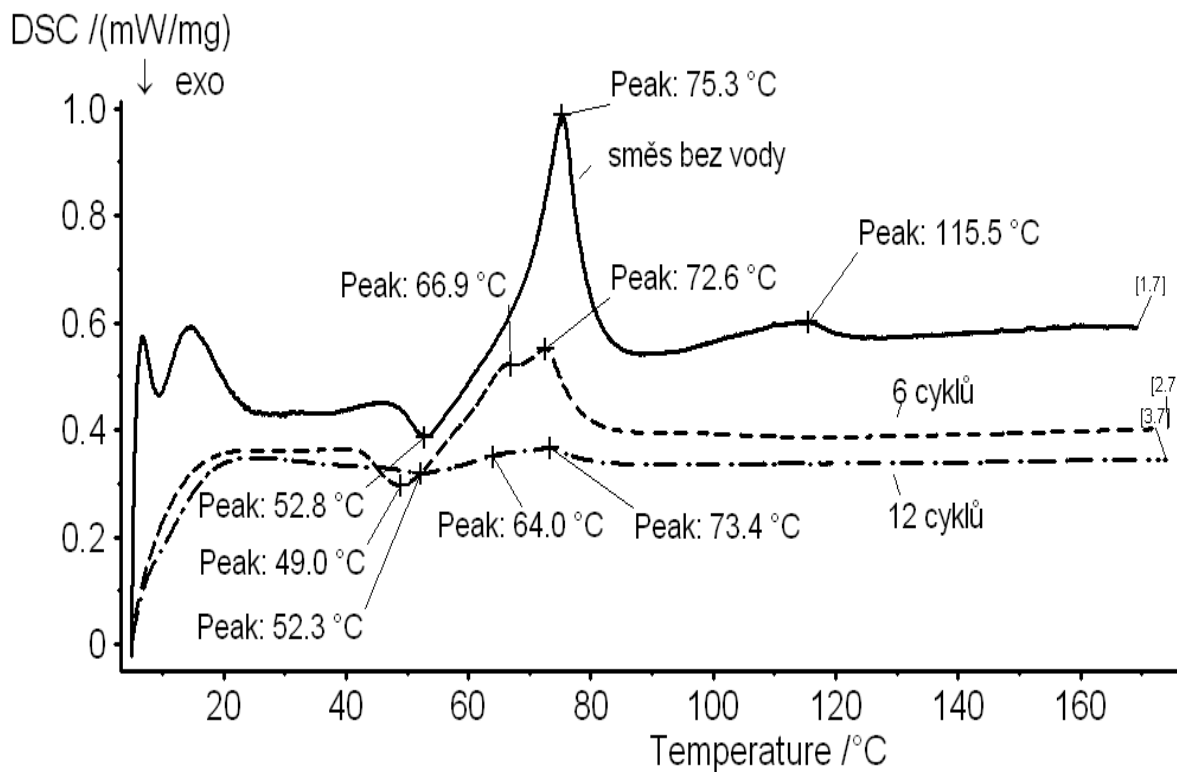
Graf č.14

Porovnání vzorků cholesterolu, syntetického ceramidu v poměru 1:1 bez vody, s ultra čistou vodou po 6 a 12 cyklech na ultrazvukové lázni

a) první ohřev



b) druhý ohřev

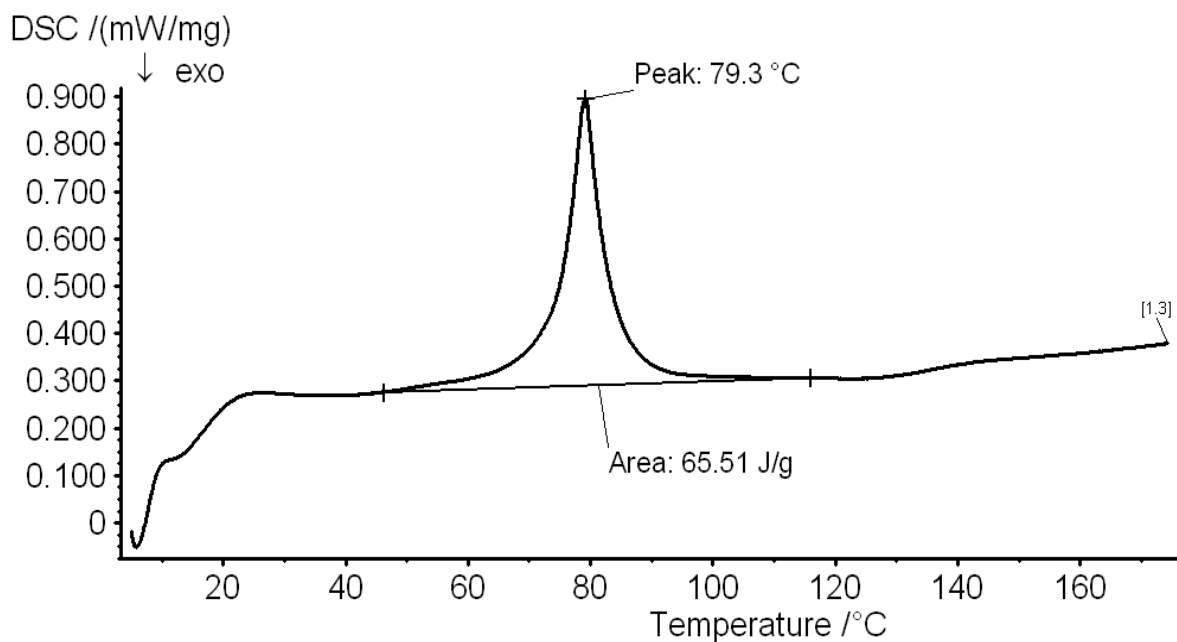


Graf č.15, vzorek č.11

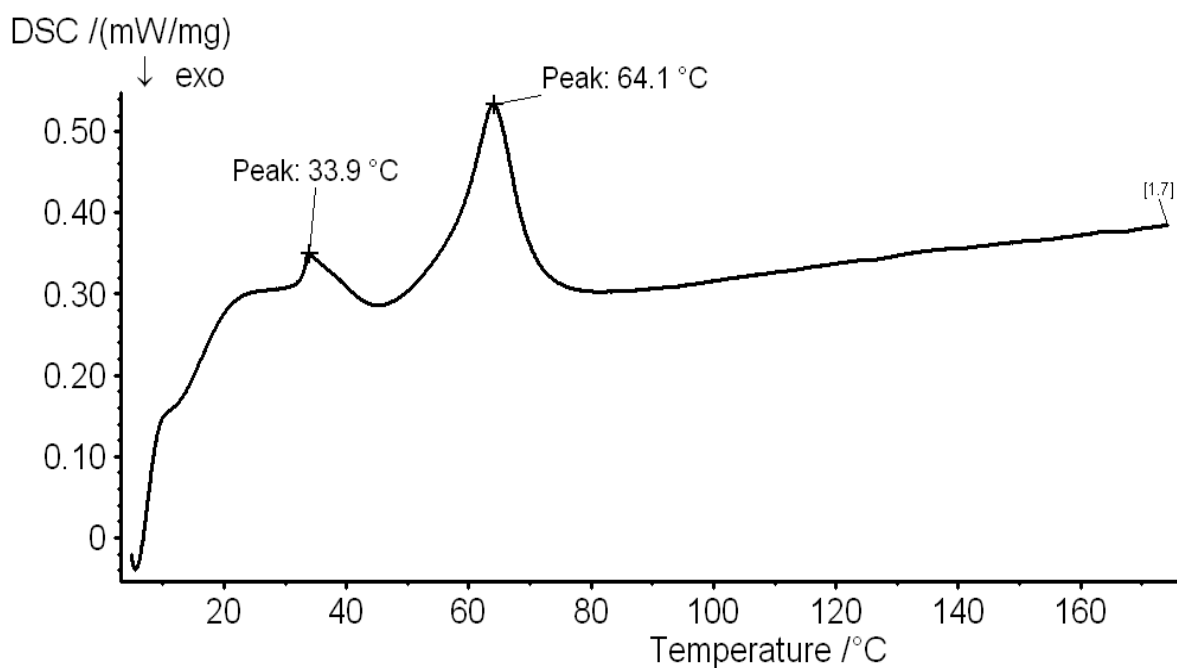
**Směs cholesterolu, syntetického ceramidu v poměru 1:1 a ultra čisté vody po 6 cyklech na třepačce, změřeno po cca 11 měsících stání ve víalce při pokojové teplotě**

Navážka: 7,270 mg

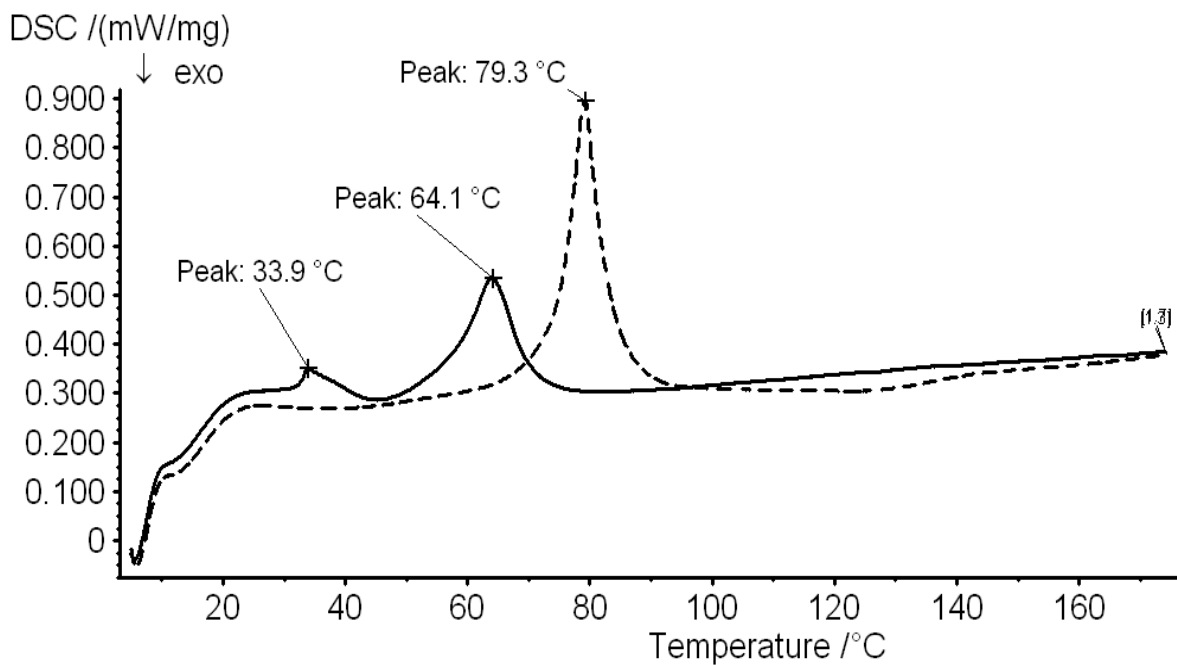
a) první ohřev



b) druhý ohřev



c) porovnání prvního a druhého ohřevu



přerušovaná čára ... první ohřev

plná čára ... druhý ohřev

Tabulka č.4

**Teploty tání vzorků směsi cholesterolu a synt. ceramidu v poměru 1:1, cholesterolu a synt. ceramidu v poměru 1:1 s ultra čistou vodou po 6 a 12 cyklech na ultrazvukové lázni a po 6 cyklech na třepačce**

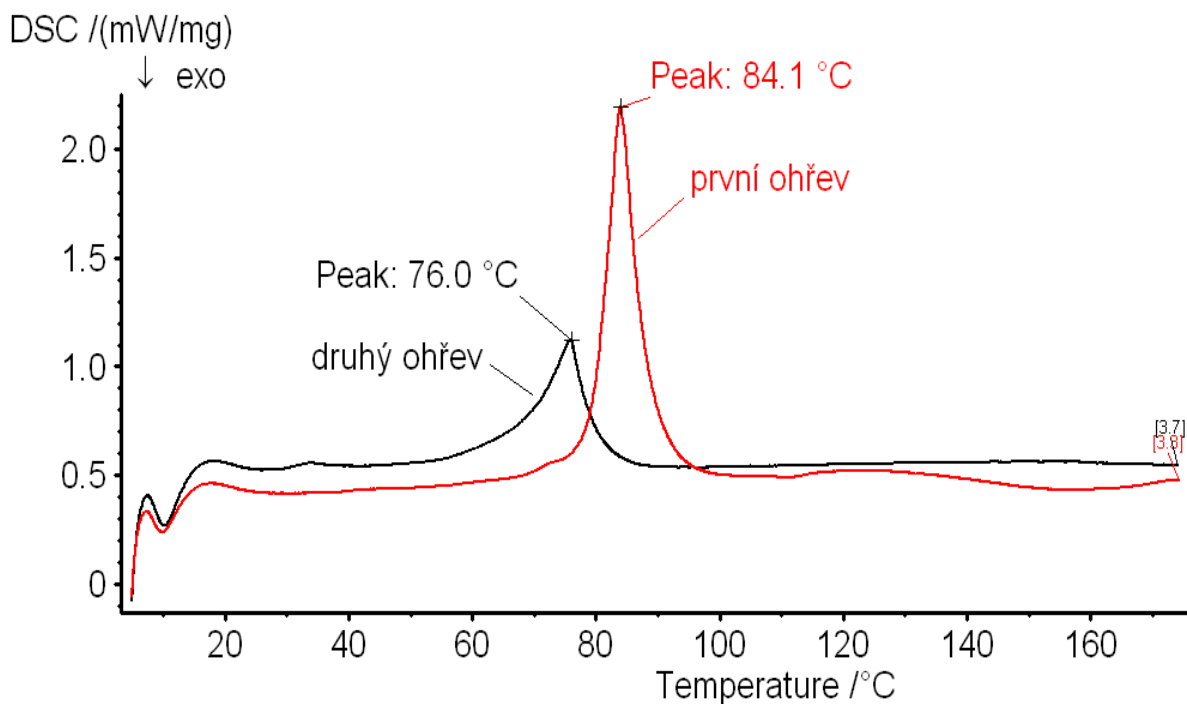
Vzorky	Teplota tání [°C]			
	1. ohřev	2. ohřev		
Cholesterol, synt.ceramid 1:1	83,6-145	52,8 (exo)	75,3	115,5
Cholesterol, synt. ceramid 1:1, voda ( 6 cyklů, ultrazvuk.lázeň)	74,1	49,0 (exo)	66,9-72,6	-
Cholesterol, synt. ceramid 1:1, voda ( 12 cyklů, ultrazvuk.lázeň)	71,1-78,6	52,3 (exo)	64,0-73,4	-
Cholesterol, synt. ceramid 1:1, voda ( 6 cyklů, třepačka)	79,3	33,9	64,1	-

Graf č.16, vzorek č.12

**Směs cholesterolu a syntetického ceramidu v poměru 1:5**

Navážka: 3,18 mg

Porovnání prvního a druhého ohřevu

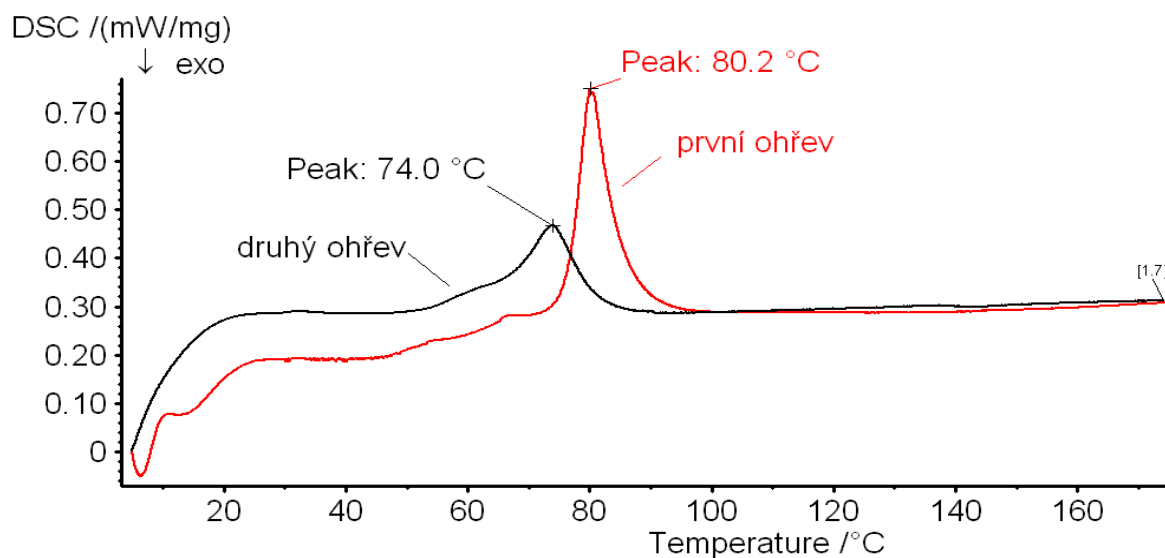


Graf č.17, vzorek č.13

**Směs cholesterolu, syntetického ceramidu v poměru 1:5 a ultra čisté vody po 6 cyklech na ultrazvukové lázni**

Navážka: 17,10mg

Porovnání prvního a druhého ohřevu

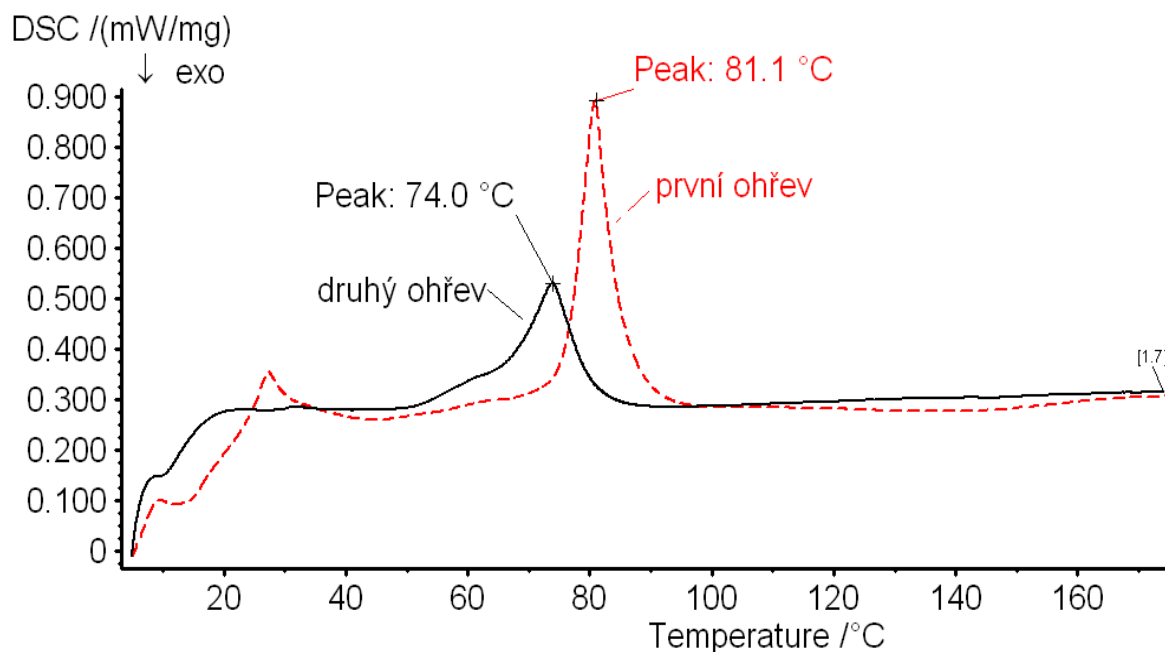


Graf č.18, vzorek č.14

**Směs cholesterolu, syntetického ceramidu v poměru 1:5 a ultra čisté vody po 12 cyklech na ultrazvukové lázni**

Navážka: 13,66 mg

Porovnání prvního a druhého ohřevu

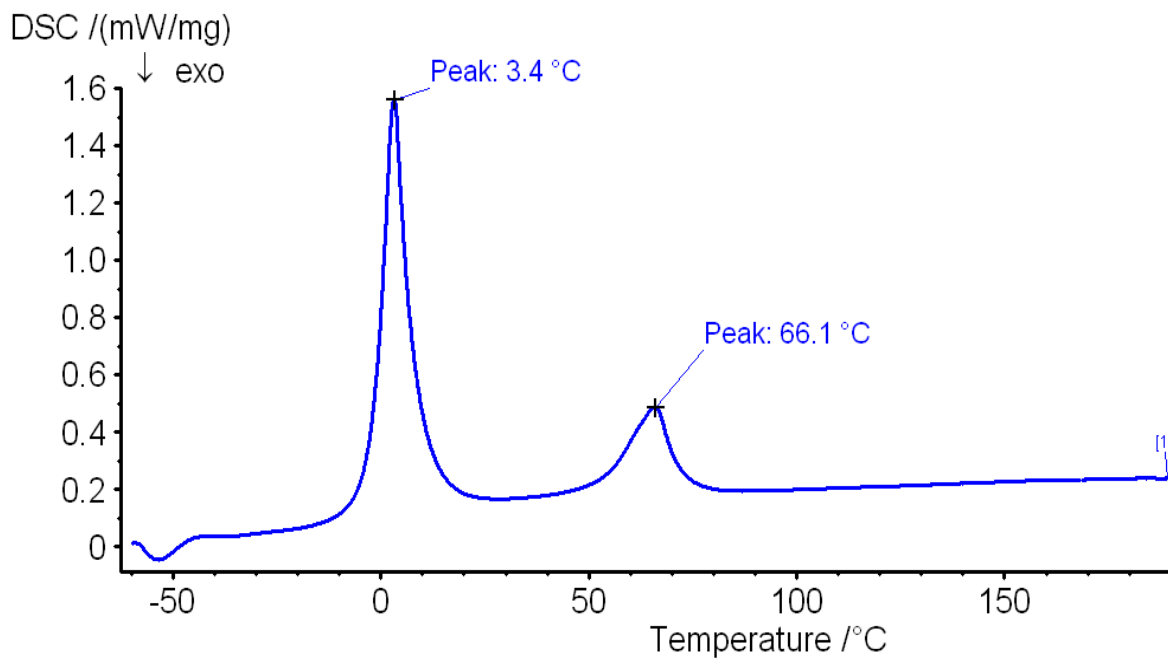




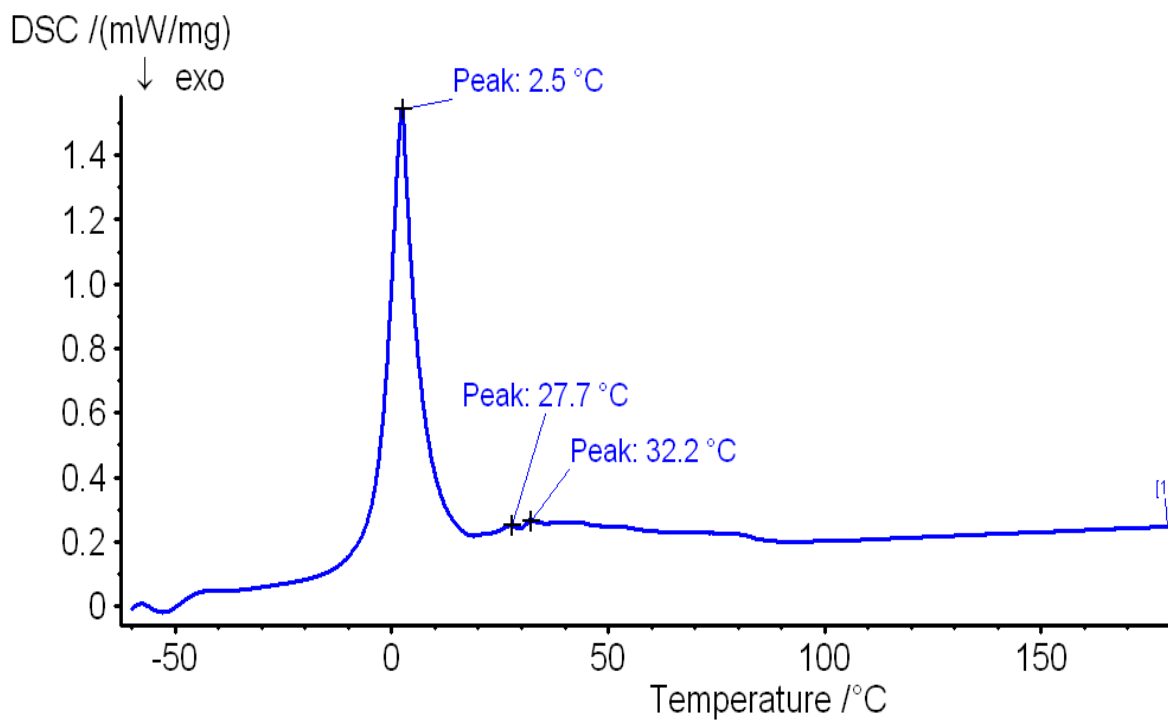
Graf č.19

Opakování měření vzorku č.14 po cca 5 měsících stání v kelímku, měření s chlazením na výchozí teplotu  $-60^{\circ}\text{C}$

a) první ohřev



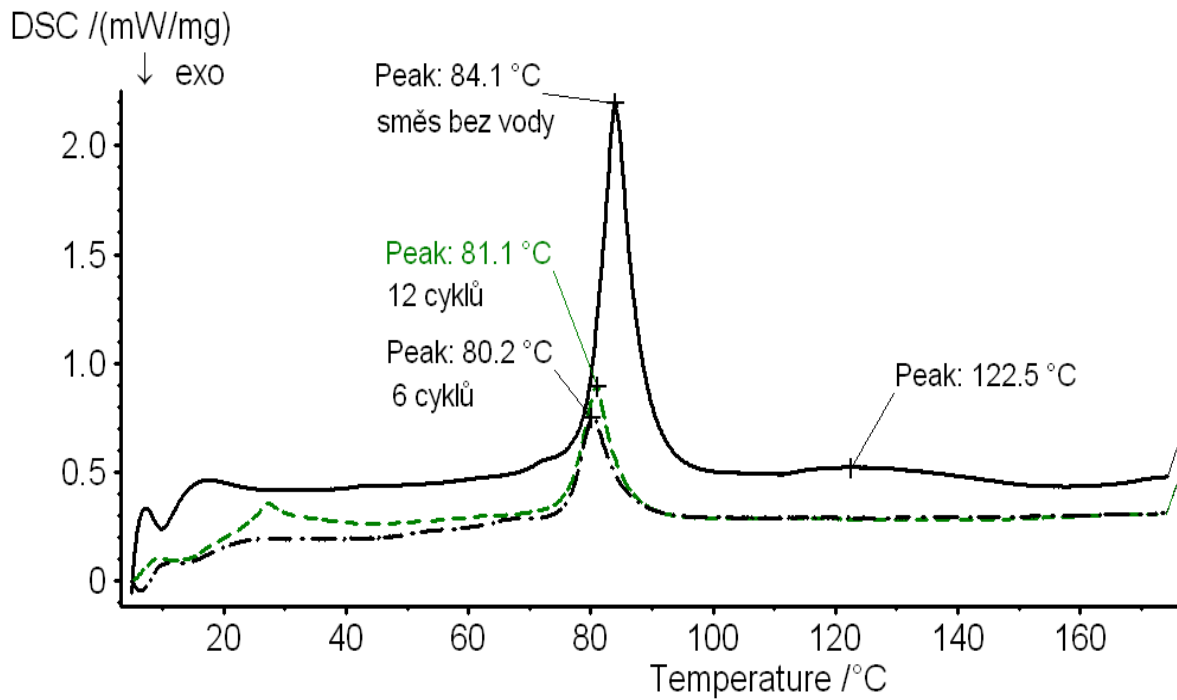
b) druhý ohřev



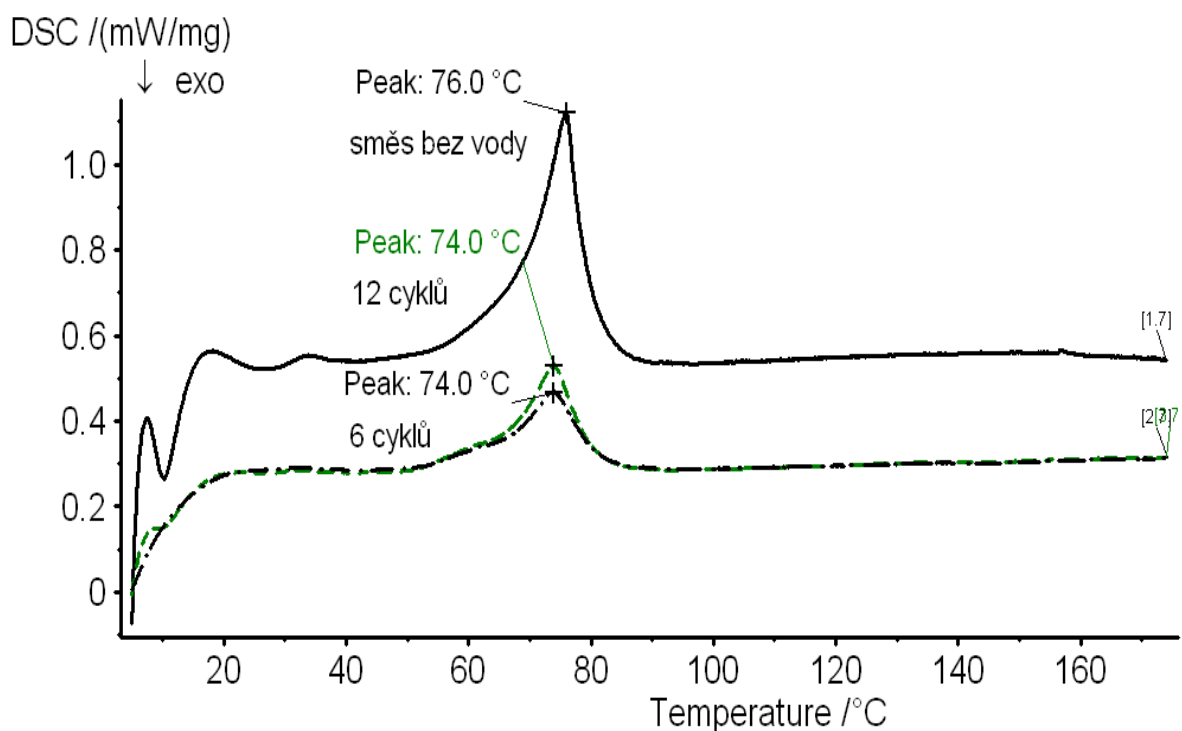
Graf č.20

Porovnání vzorků cholesterolu, syntetického ceramidu v poměru 1:5 bez vody, s ultra čistou vodou po 6 a 12 cyklech na ultrazvukové lázni

a) první ohřev



b) druhý ohřev



Tabulka č.5

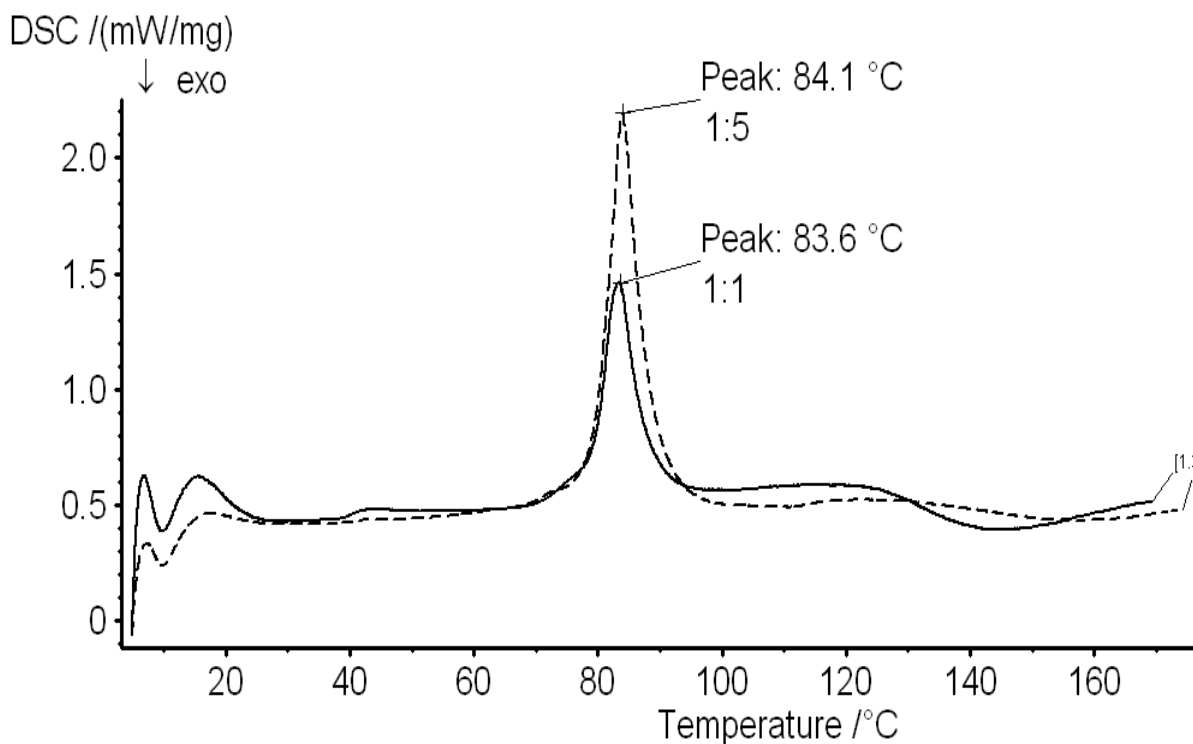
**Teploty tání vzorků směsi cholesterolu a synt. ceramidu v poměru 1:5, cholesterolu a synt. ceramidu v poměru 1:5 s ultra čistou vodou po 6 a 12 cyklech na ultrazvukové lázni**

Vzorky	Teplota tání [°C]		Teplota tání [ J/g ]	
	1.ohřev	2.ohřev	1.ohřev	2.ohřev
Cholesterol, synt.ceramid 1:5	84,1	76,0	152,900	75,740
Cholesterol, synt. ceramid 1:5, voda ( 6 cyklů, ultrazvuk.lázeň)	80,2	74,0	54,750	28,780
Cholesterol, synt. ceramid 1:5, voda ( 12 cyklů, ultrazvuk.lázeň)	81,1	74,0	56,920	36,460

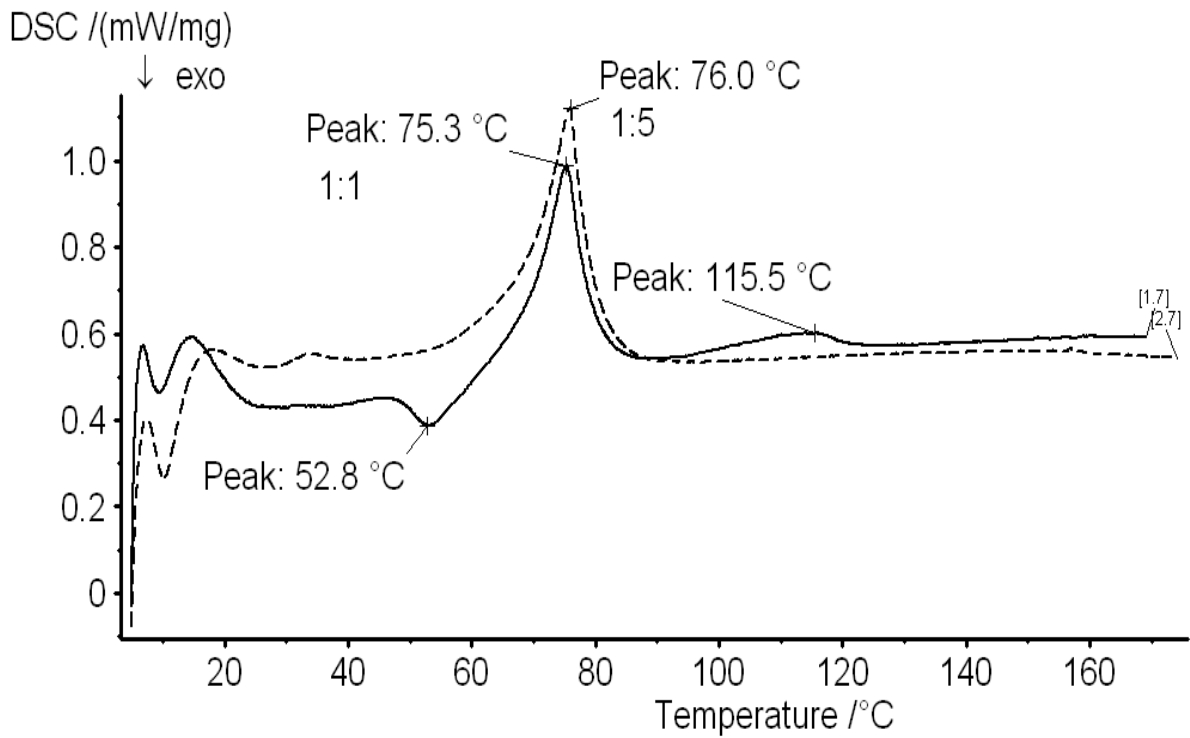
Graf č.21

Porovnání vzorků cholesterolu a syntetického ceramidu v poměru 1:1 a 1:5 bez vody

a) první ohřev



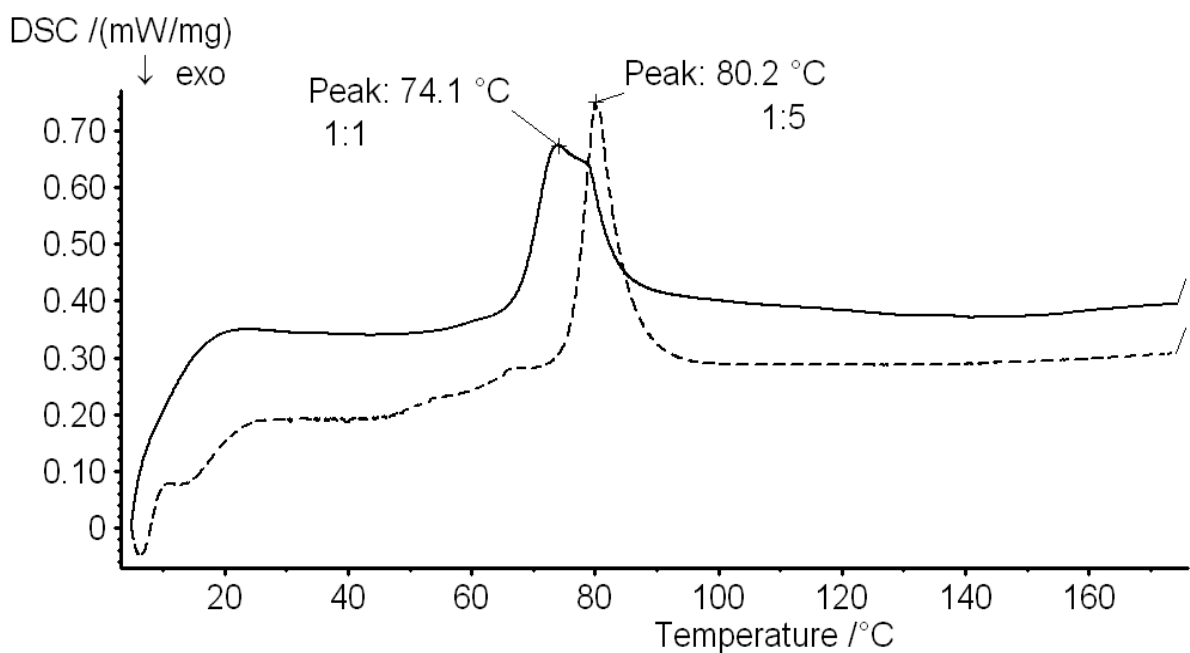
b) druhý ohřev



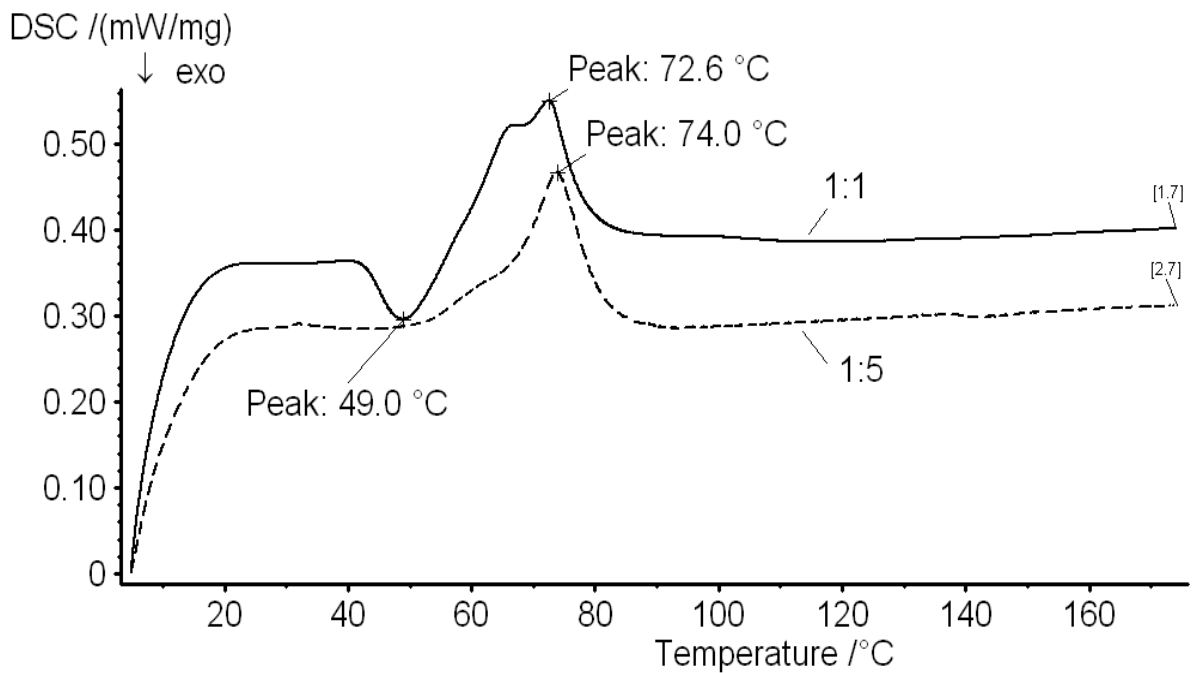
Graf č.22

Porovnání vzorků cholesterolu a syntetického ceramidu v poměru 1:1 a 1:5 s ultra čistou vodou po 6 cyklech na ultrazvukové lázni

a) první ohřev



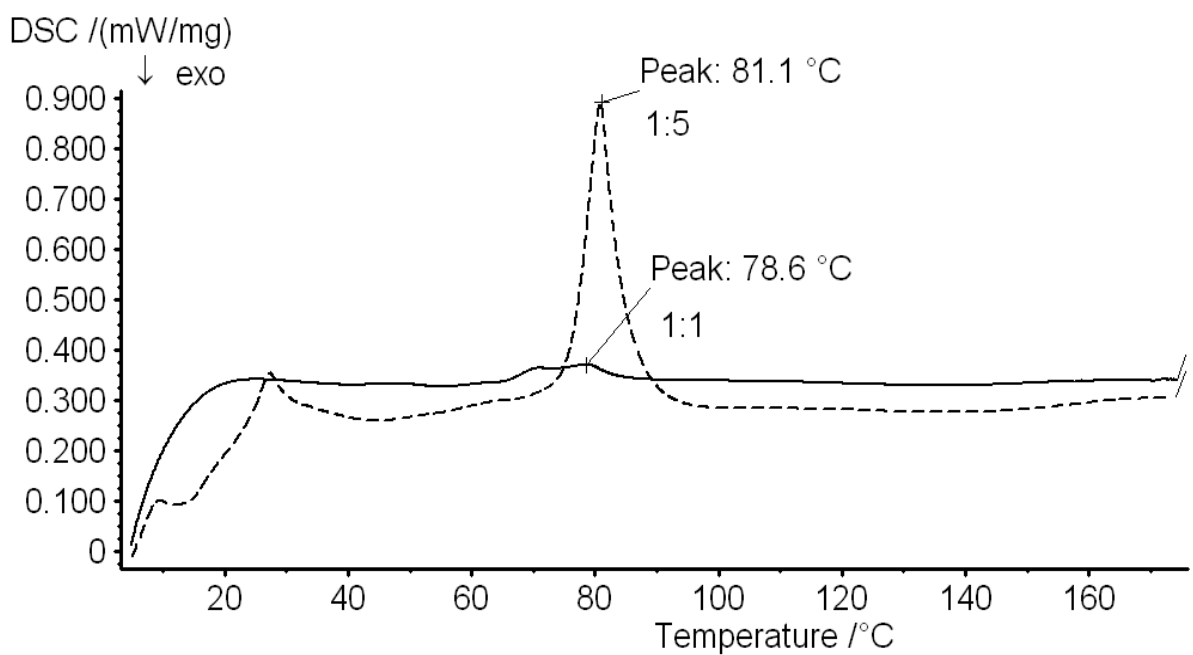
b) druhý ohřev



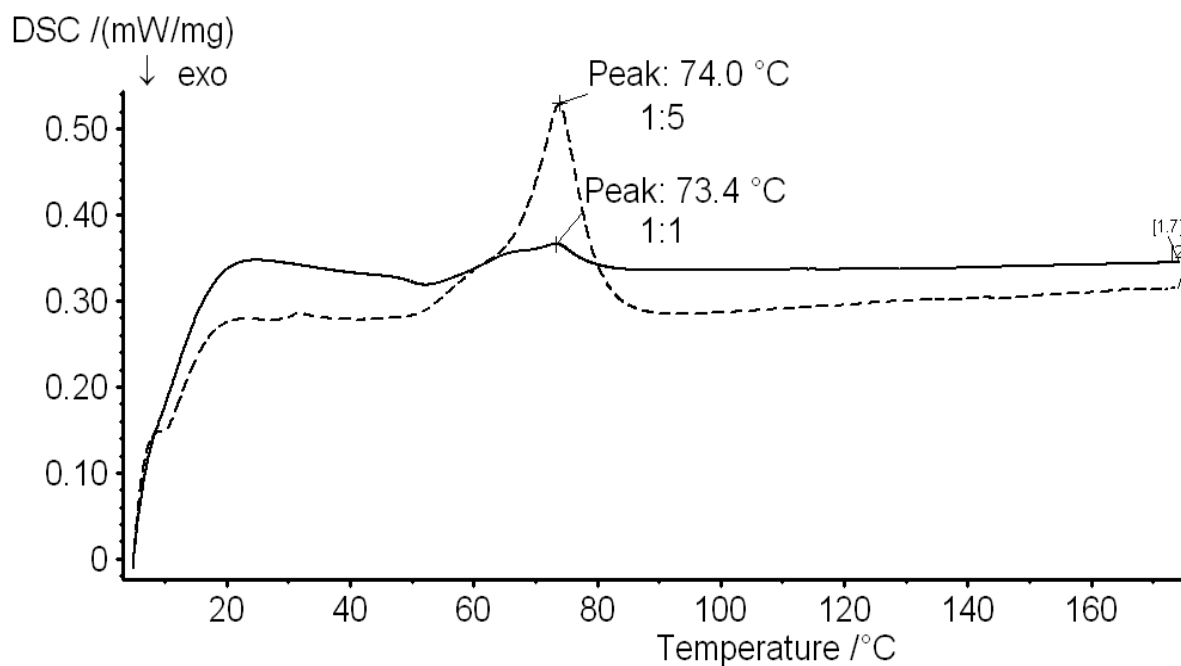
Graf č.23

Porovnání vzorků cholesterolu a syntetického ceramidu v poměru 1:1 a 1:5 s ultra čistou vodou po 12 cyklech na ultrazvukové lázni

a) první ohřev



b) druhý ohřev



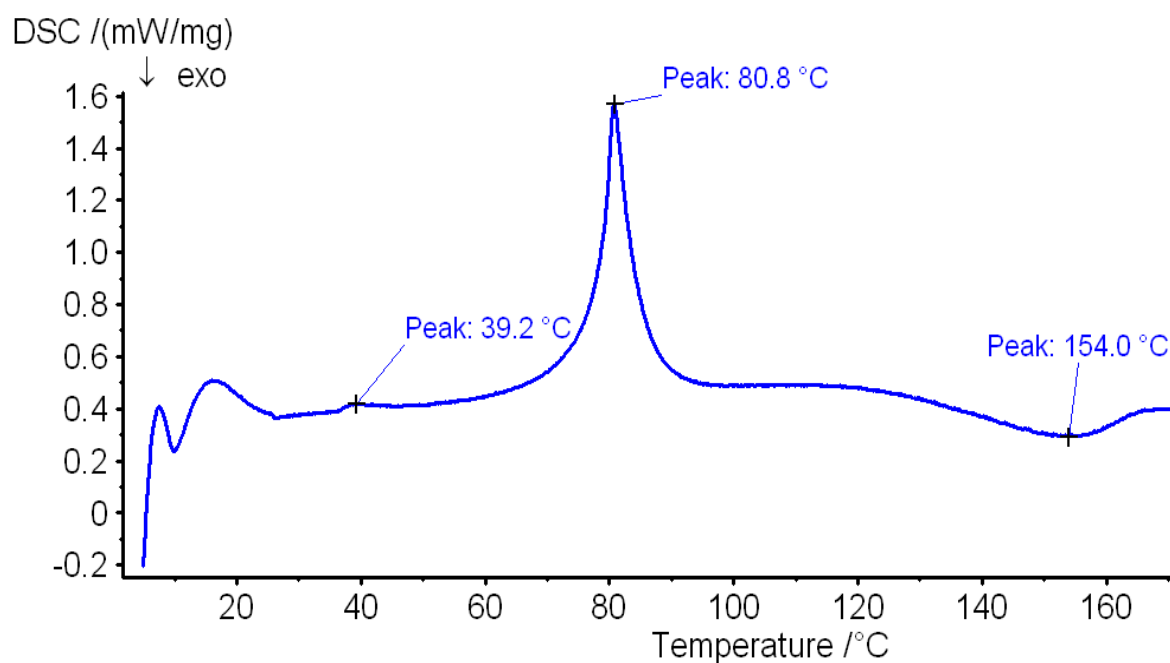
3.5.4 Směs cholesterolu, syntetického ceramidu a kyseliny olejové, DSC

Graf č.24, vzorek č.15

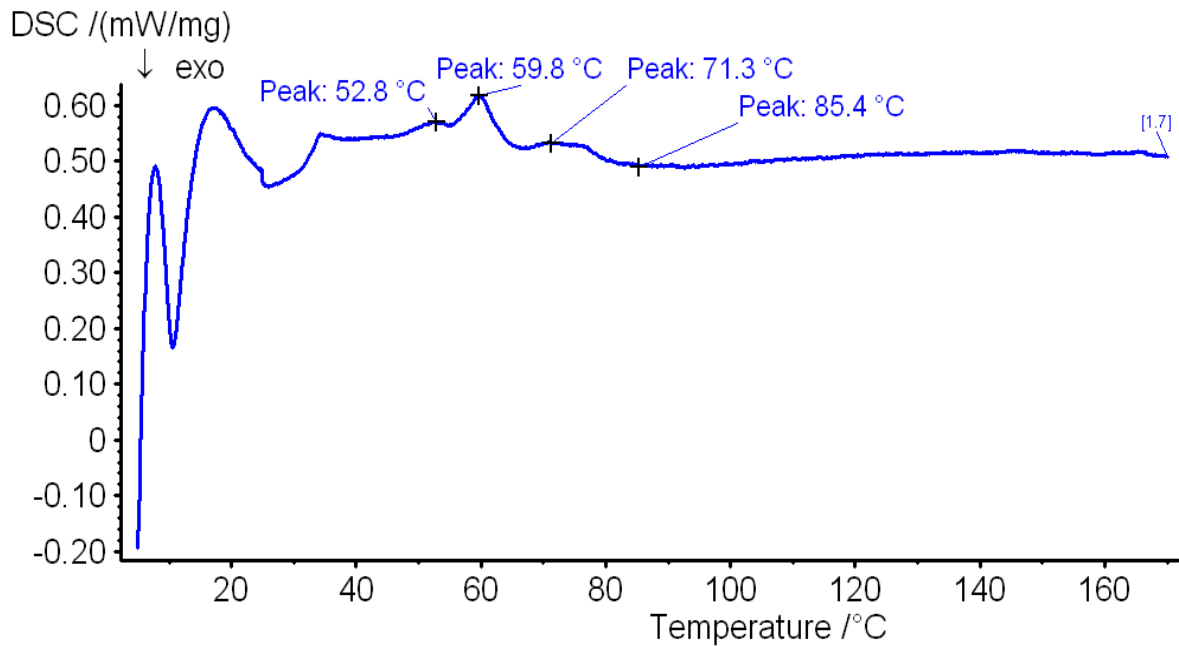
**Směs cholesterolu, syntetického ceramidu a kyseliny olejové v poměru 4:8:1**

Navážka: 1,89 mg

a) první ohřev



b) druhý ohřev

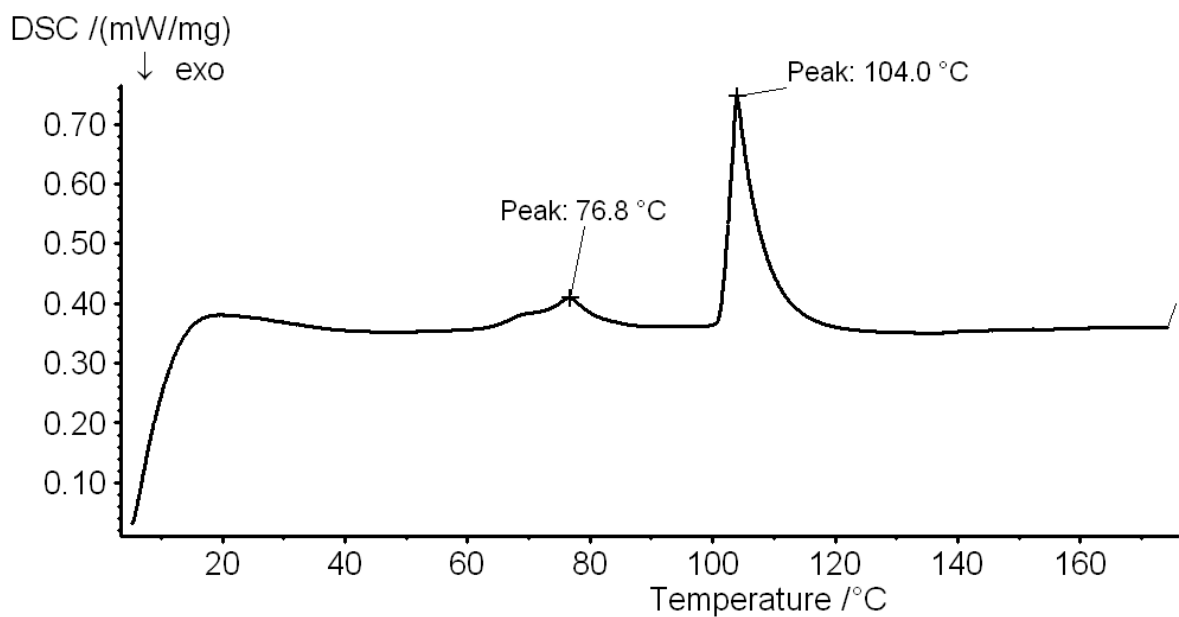


Graf č.25, vzorek č.16

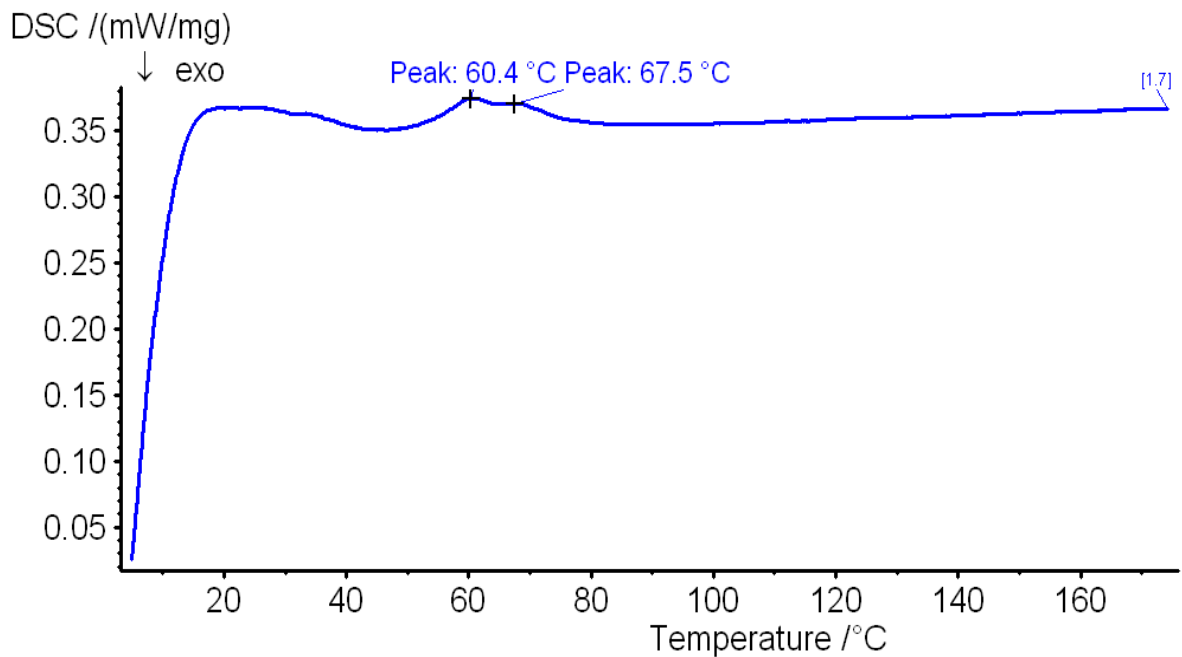
**Směs cholesterolu, syntetického ceramidu, kyseliny olejové v poměru 4:8:1 a ultra čisté vody po 6 cyklech na ultrazvukové lázni**

Navážka: 38,55 mg

a) první ohřev



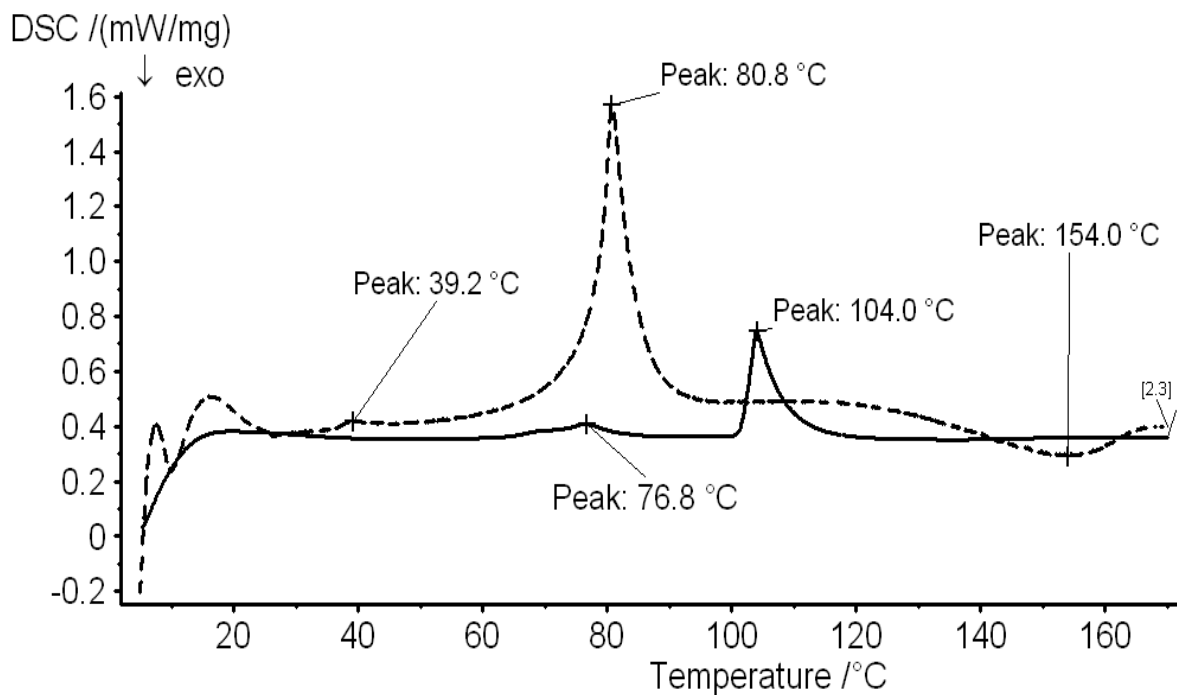
b) druhý ohřev



Graf č.26

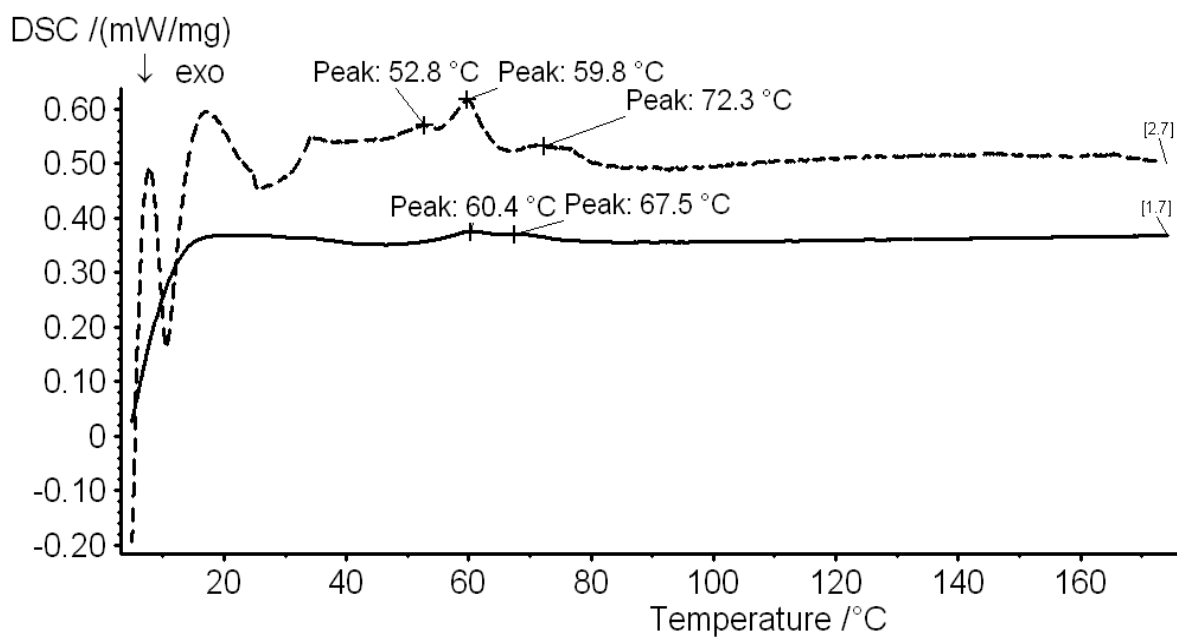
Porovnání vzorků cholesterolu, syntetického ceramidu, kyseliny olejové v poměru 4:8:1 bez vody a s ultra čistou vodou po 6 cyklech na ultrazvukové lázni

a) první ohřev





b) druhý ohřev



přerušovaná čára ... směs bez vody

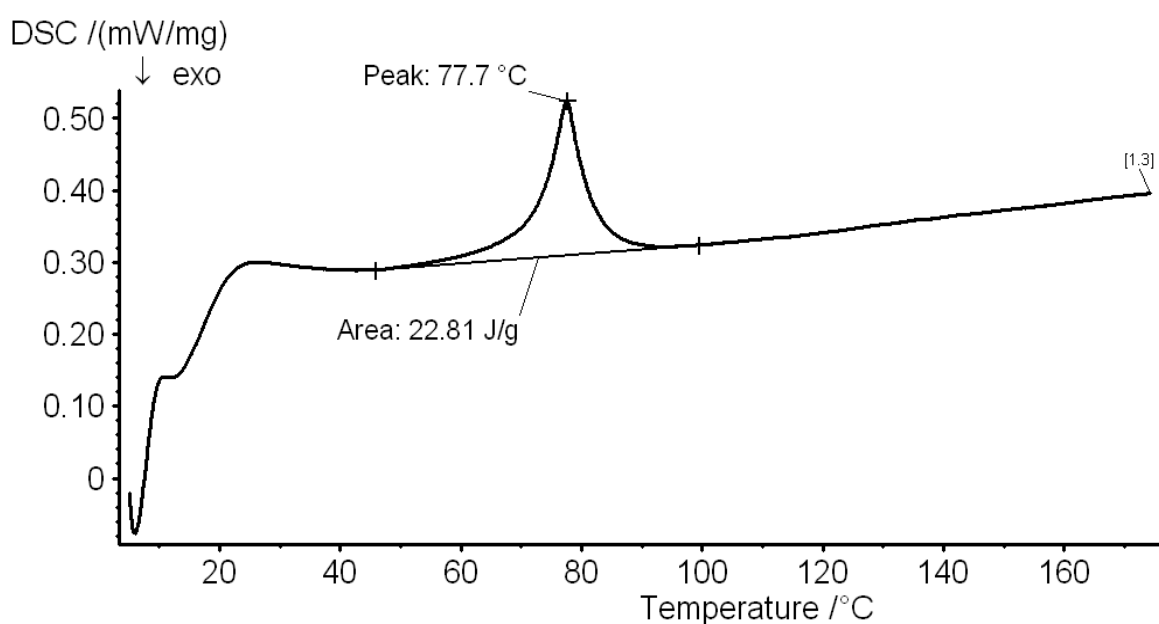
plná čára ... směs s ultra čistou vodou po 6 cyklech

Graf č.27, vzorek č.17

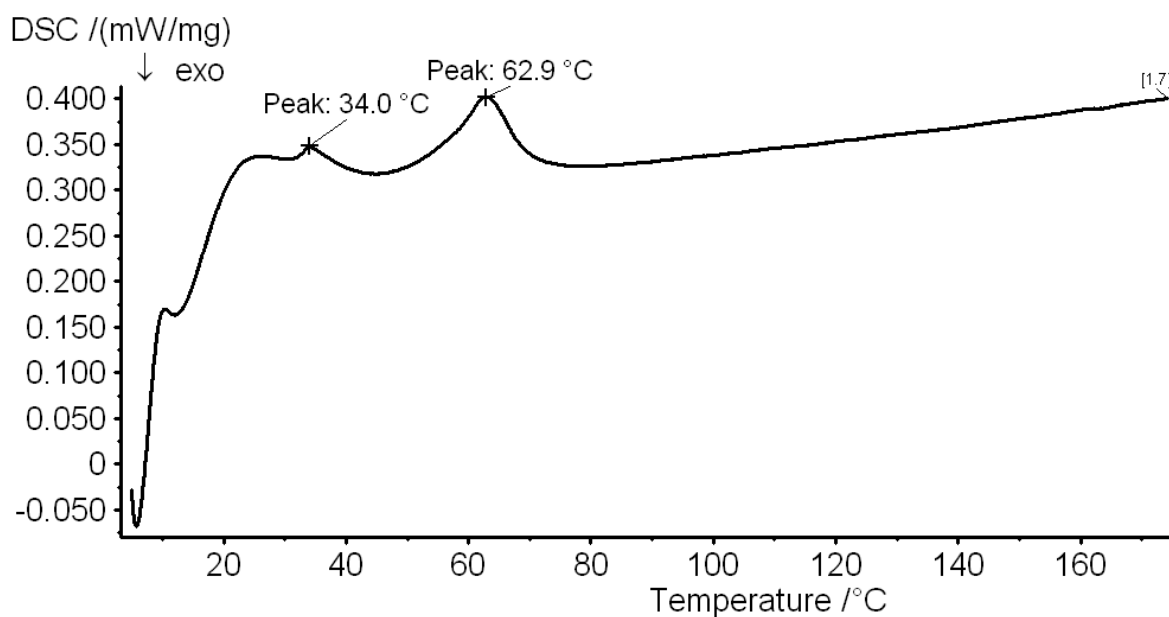
**Směs cholesterolu, syntetického ceramidu, kyseliny olejové v poměru 4:8:1 a ultra čisté vody po 6 cyklech na třepačce, změřeno po cca 11 měsících stání ve víalce při pokojové teplotě**

Navážka: 8,390 mg

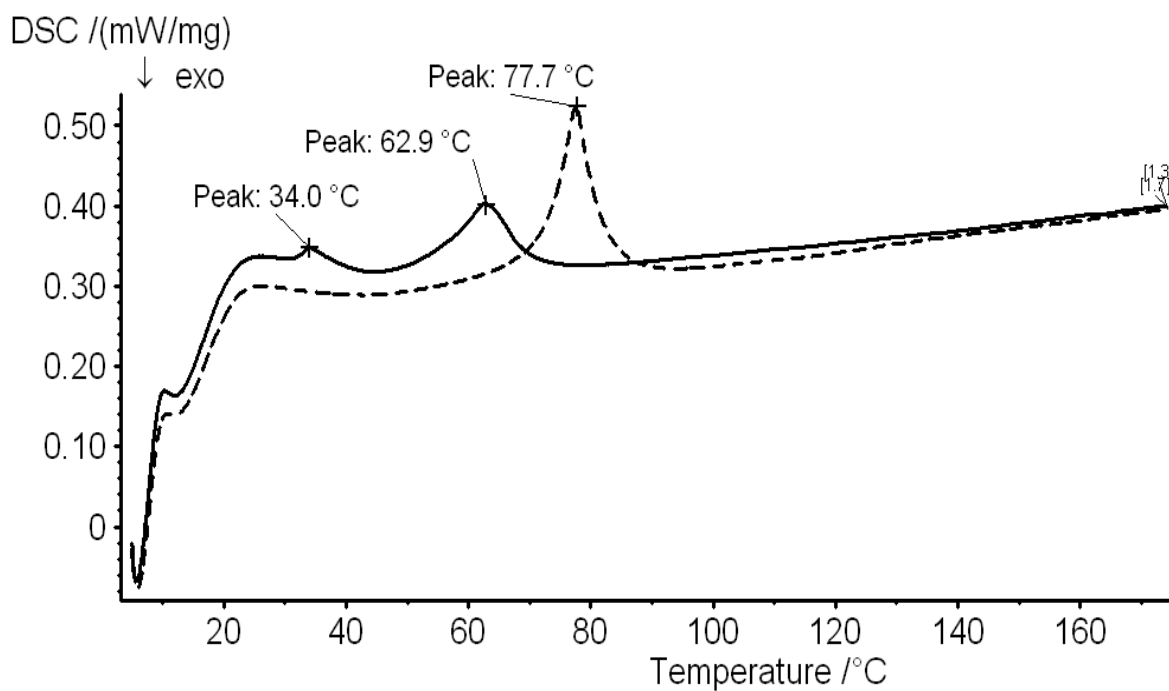
a) první ohřev



b) druhý ohřev



c) porovnání prvního a druhého ohřevu



přerušovaná čára ... první ohřev

plná čára ... druhý ohřev

Tabulka č.6

**Teploty tání vzorků směsi cholesterolu, syntetického ceramidu, kyseliny olejové v poměru 4:8:1 bez vody a s ultra čistou vodou po 6 cyklech na ultrazvukové lázni a po 6 cyklech na třepačce**

Vzorky	Teplota tání [°C]			
	1.ohřev		2.ohřev	
Cholesterol, synt. ceramid, kys.olejová 4:8:1	80,8	-	rozpad píku v teplotní oblasti 30-85°C	
Cholesterol, synt. ceramid, kys.olejová 4:8:1 voda ( 6 cyklů, ultrazvuk.lázeň)	76,8	104,0	-	60,4 - 67,5
Cholesterol, synt. ceramid, kys.olejová 4:8:1 voda ( 6 cyklů, třepačka)	77,7	-	34,0	62,9

### 3.5.5 Makroskopické vzorky

Tabulka č.7

#### Seznam preparátů ve viálkách

Číslo vzorku	
1	cholesterol, voda (12 cyklů na ultrazvukové lázni)
2	syntetický ceramid, voda (12 cyklů na ultrazvukové lázni)
3	cholesterol, syntetický ceramid 1:5, voda (12 cyklů na ultrazvukové lázni)
4	cholesterol, syntetický ceramid 1:1, voda (12 cyklů na ultrazvukové lázni)
5	cholesterol, syntetický ceramid, kys. olejová 4:8:1, voda (6 cyklů na ultrazvukové lázni)
6	cholesterol, přírodní ceramid 1:1, voda (6 cyklů na třepačce)
7	cholesterol, syntetický ceramid 1:1, voda (6 cyklů na třepačce)
8	cholesterol, syntetický ceramid, kys. olejová 4:8:1, voda (6 cyklů na třepačce)
9	cholesterol, voda (6 cyklů na třepačce)

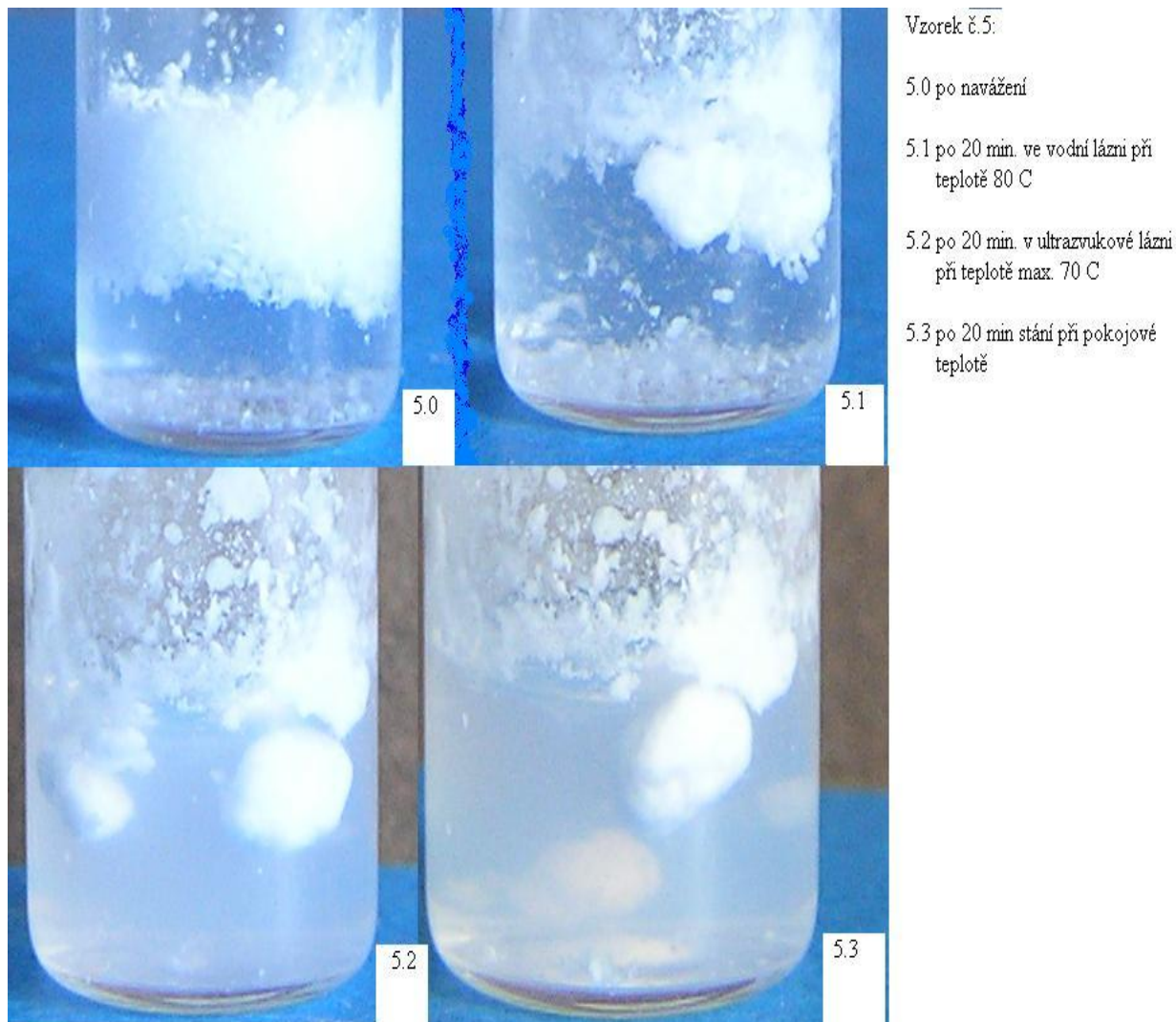
#### Vzorky č.1-4. po 12 cyklech hydratace na ultrazvukové lázni



### Vzorek č.5

Směs cholesterolu, syntetického ceramidu, kyseliny olejové v poměru 4:8:1 a ultra čisté vody po 6 cyklech hydratace na ultrazvukové lázni

a) první výřez



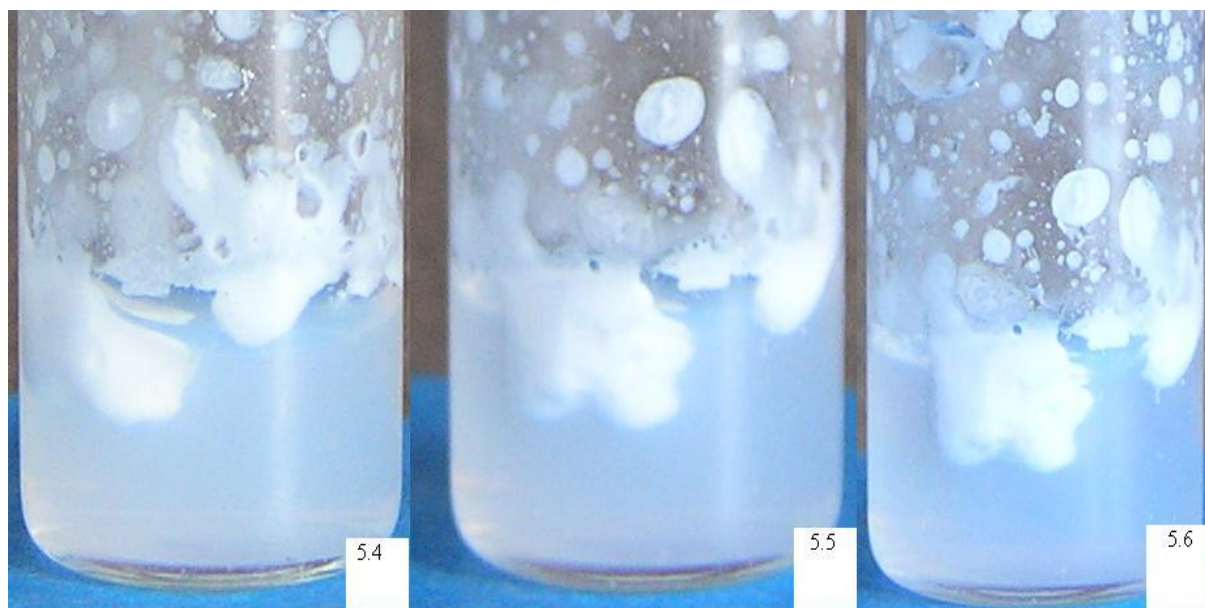
5.0 ... po navážení

5.1 ... po 20 min ve vodní lázni při teplotě max. 80°C

5.2 ... po 20 min v ultrazvukové lázni při teplotě max. 70°C

5.3 ... po 20 min stání při pokojové teplotě

b) druhý výřez



Vzorek č. 5:

5.4 po 20 min ve vodní lázni při teplotě 80 C

5.5 po 20 min v ultrazvukové lázni při teplotě max 70 C

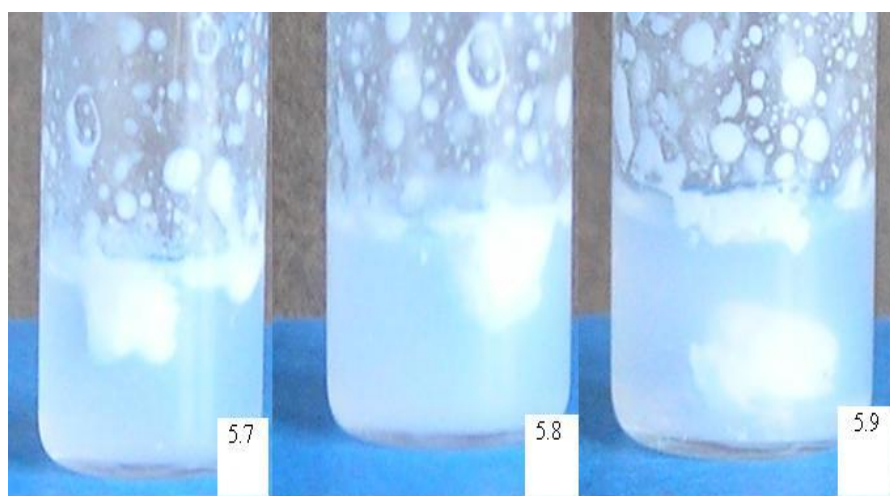
5.6 po 20 min stání při pokojové teplotě

5.4 ... po 20 min ve vodní lázni při teplotě max. 80°C

5.5 ... po 20 min v ultrazvukové lázni při teplotě max. 70°C

5.6 ... po 20 min stání při pokojové teplotě

c) třetí výřez

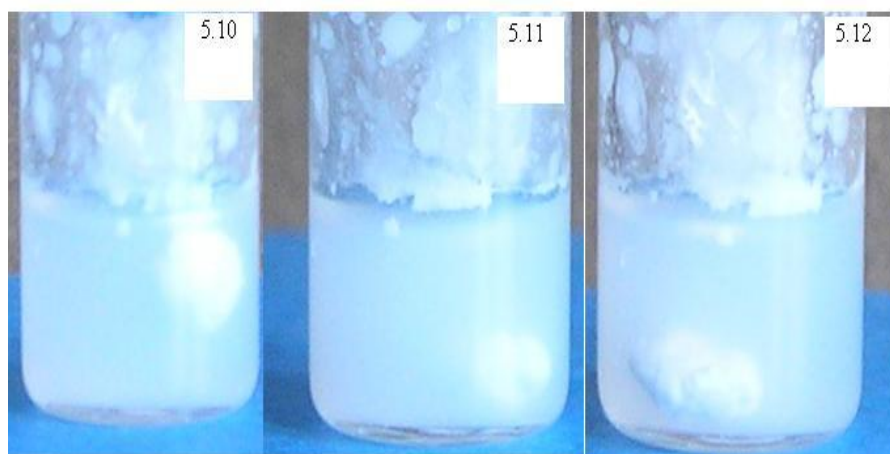


Vzorek č. 5:

5.7 po 20 min ve vodní lázni při teplotě 80 C

5.8 po 20 min v ultrazvukové lázni při teplotě max 70 C

5.9 po 20 min stání při pokojové teplotě



5.10 po 20 min ve vodní lázni při teplotě 80 C

5.11 po 20 min v ultrazvukové lázni při teplotě max 70 C

5.12 po 20 min stání při pokojové teplotě

5.7 ... po 20 min ve vodní lázni při teplotě max. 80°C

5.8 ... po 20 min v ultrazvukové lázni při teplotě max. 70°C

5.9 ... po 20 min stání při pokojové teplotě

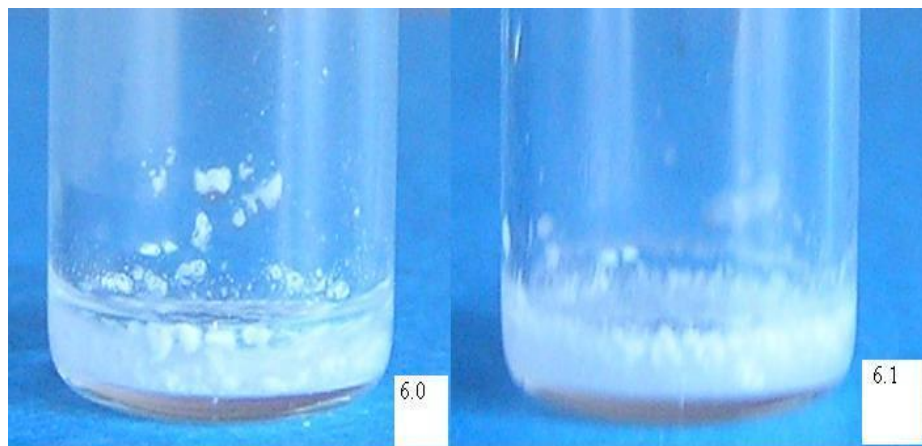
5.10 ... po 20 min ve vodní lázni při teplotě max. 80°C

5.11 ... po 20 min v ultrazvukové lázni při teplotě max. 70°C

5.12 ... po 20 min stání při pokojové teplotě

### Vzorek č.6

Směs cholesterolu, přírodního ceramidu v poměru 1:1 a ultra čisté vody po 6 cyklech hydratace na třepačce



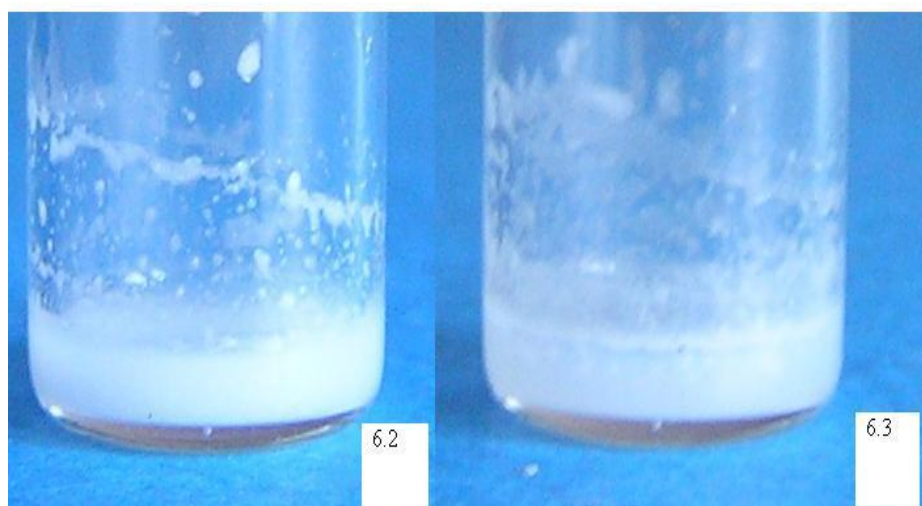
Vzorek č.6:

6.0 po navážení

6.1 po 20 min na vodní lázni při teplotě 80 C

6.2 po 20 min na třepačce

6.3 po 20 min stání při pokojové teplotě



6.0 ... po navážení

6.1 ... po 20 min na vodní lázni při teplotě max. 80°C

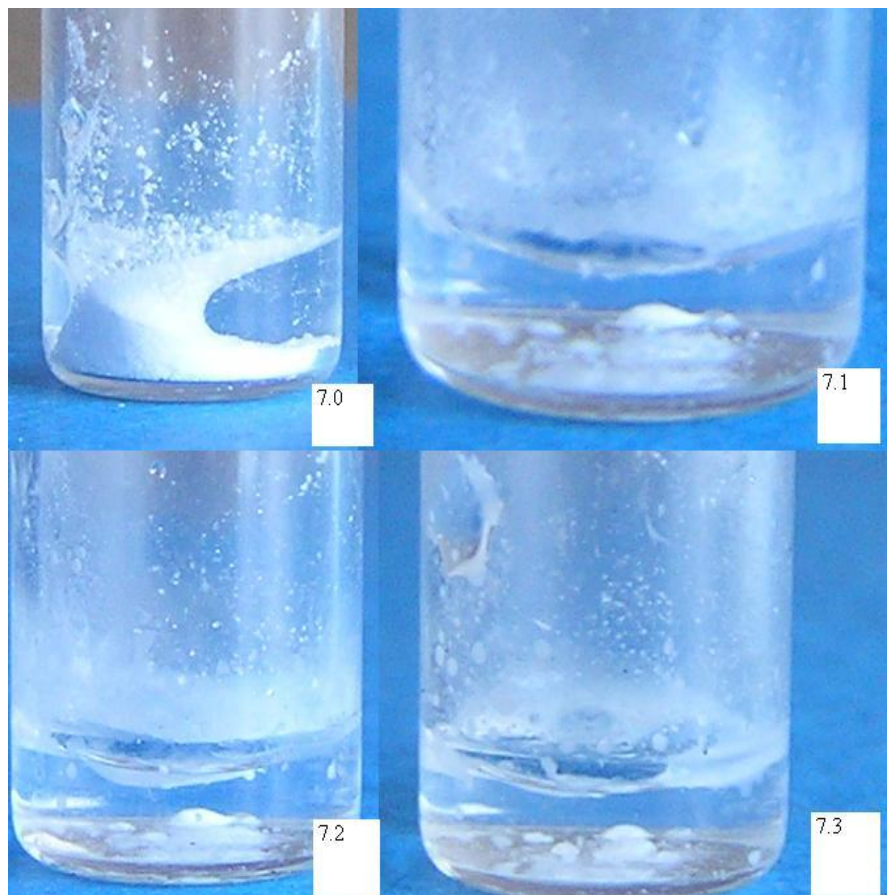
6.2 ... po 20 min na třepačce

6.3 ... po 20 min stání při pokojové teplotě



### Vzorek č.7

Směs cholesterol, syntetického ceramidu v poměru 1:1 a ultra čisté vody po 6 cyklech hydratace na třepačce



Vzorek č.7:

7.0 po navážení

7.1 po 20 min na vodní lázni při teplotě 80 C

7.2 po 20 min na třepačce

7.3 po 20 min stání při pokojové teplotě

7.0 ... po navážení

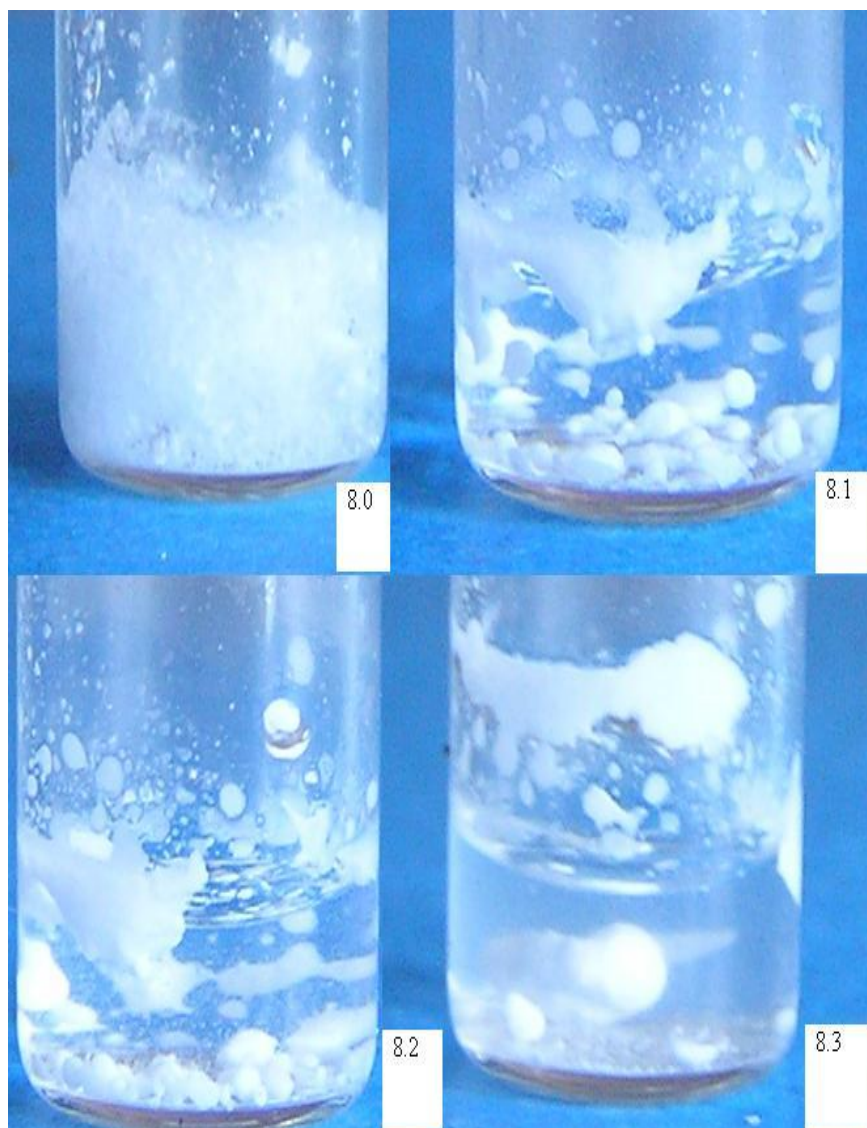
7.1 ... po 20 min na vodní lázni při teplotě max. 80°C

7.2 ... po 20 min na třepačce

7.3 ... po 20 min stání při pokojové teplotě

### Vzorek č.8

Směs cholesterolu, syntetického ceramidu, kyseliny olejové v poměru 4:8:1 a ultra čisté vody po 6 cyklech hydratace na třepačce



Vzorek č.8:

8.0 po navážení

8.1 po 20 min ve vodní lázni při teplotě 80 C

8.2 po 20 min na třepačce

8.3 po 20 min stání při pokojové teplotě

8.0 ... po navážení

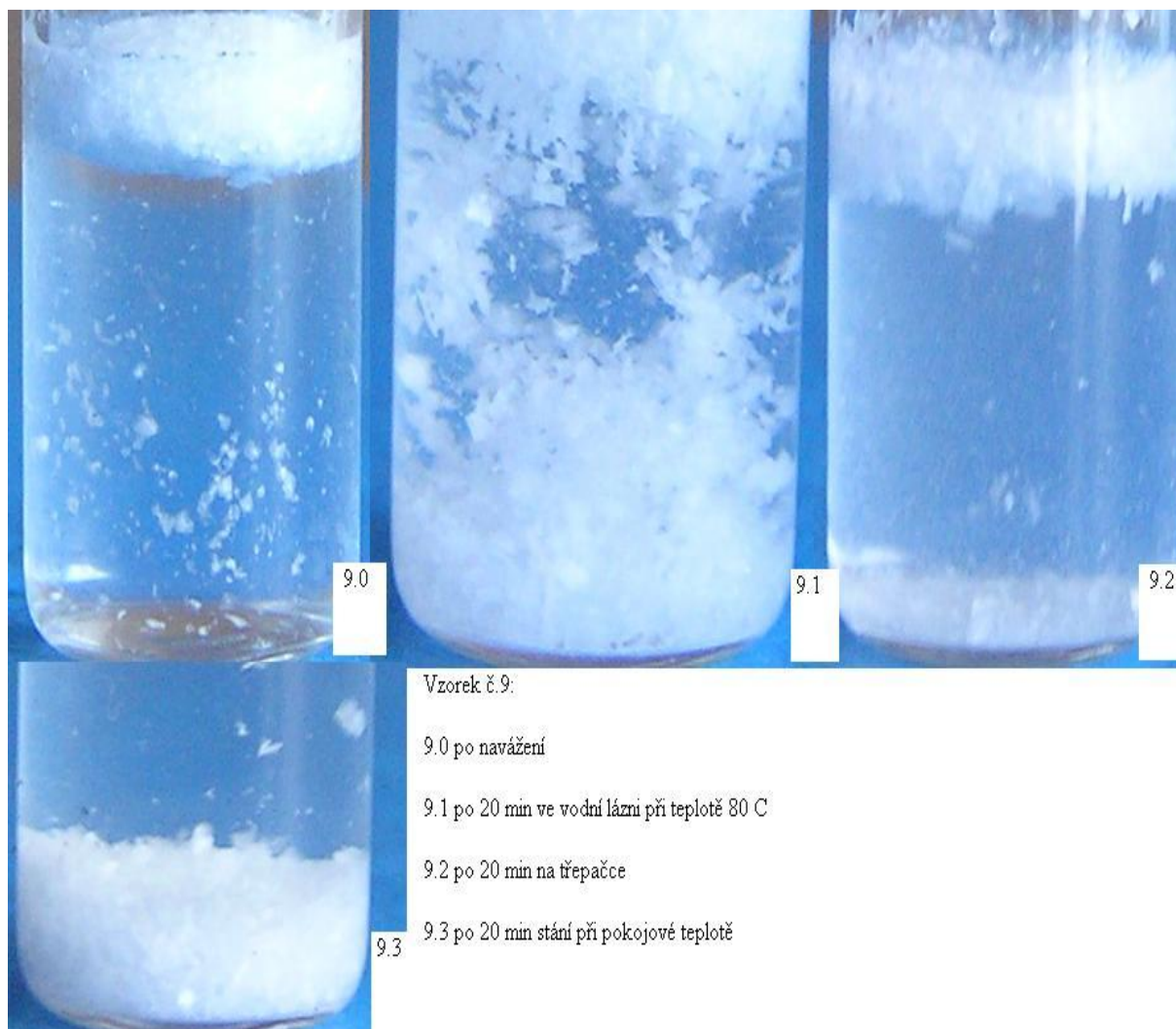
8.1 ... po 20 min na vodní lázni při teplotě max. 80°C

8.2 ... po 20 min na třepačce

8.3 ... po 20 min stání při pokojové teplotě

## Vzorek č.9

Cholesterol a ultra čistá voda po 6 cyklech hydratace na třepačce



9.0 ... po navážení

9.1 ... po 20 min na vodní lázni při teplotě max. 80°C

9.2 ... po 20 min na třepačce

9.3 ... po 20 min stání při pokojové teplotě

### 3.5.6 Mikroskopie

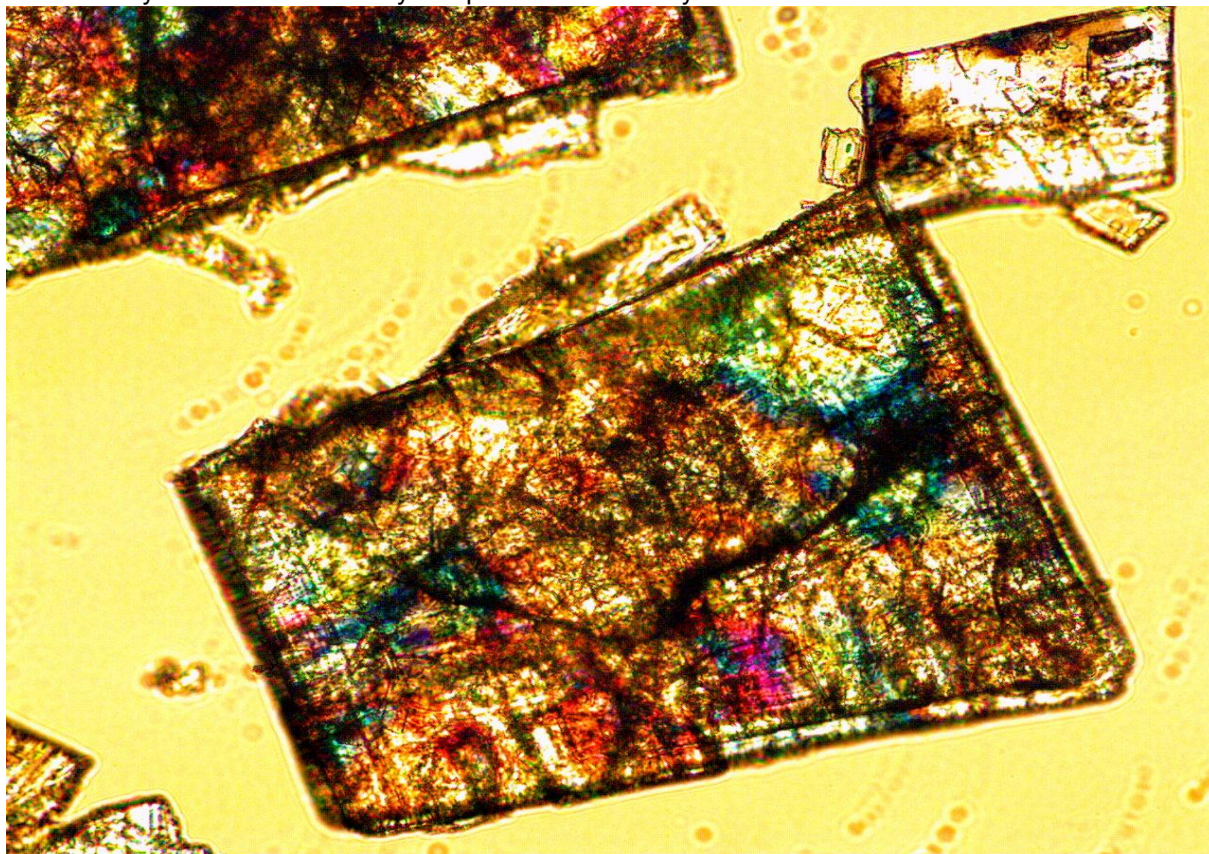
Tabulka č.8

#### Seznam mikroskopických preparátů

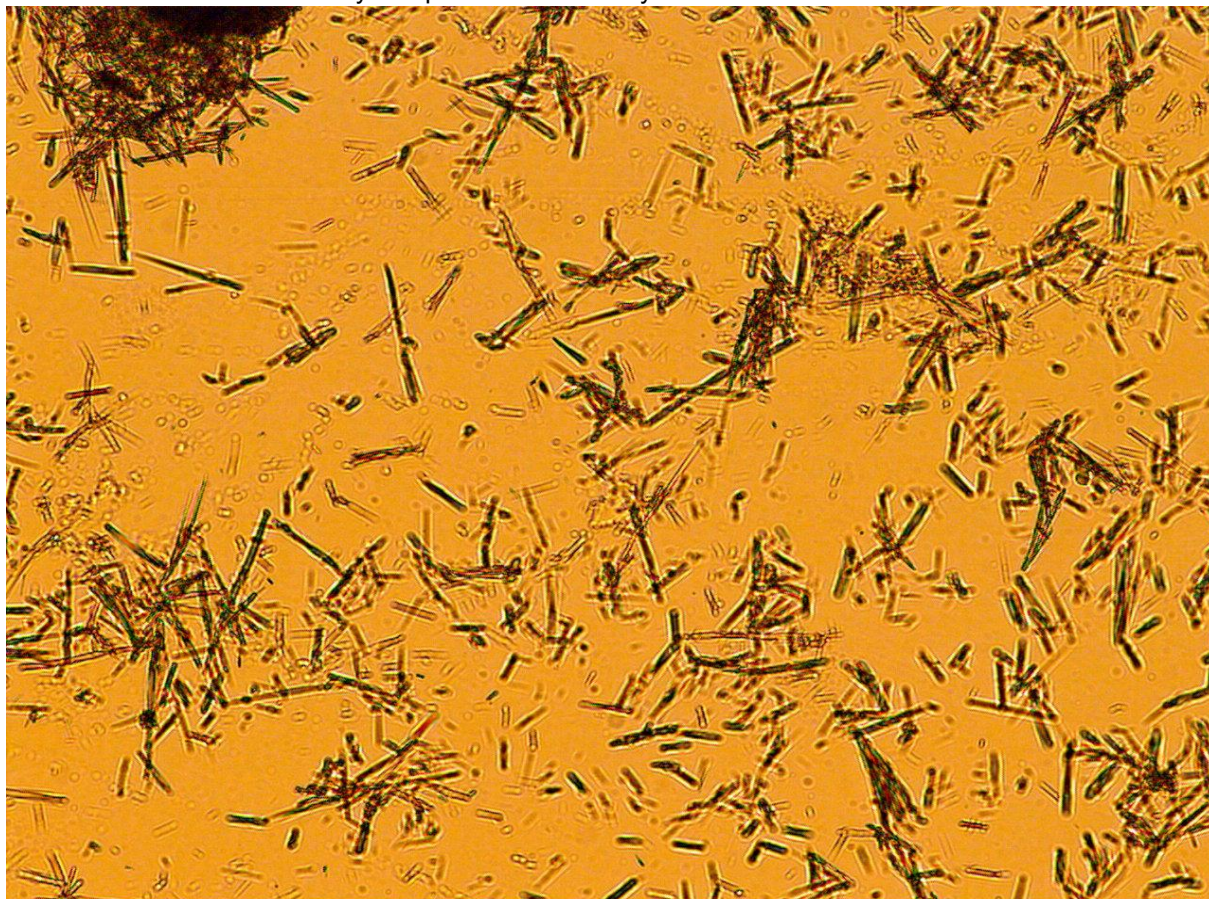
1.a	bezvodý cholesterol rozetřený v kapce ultra čisté vody, v označeném kvadrantu hned u středu kříže, s polarizačním kroužkem, obj. 10
2.a	přírodní ceramid rozetřený v kapce ultra čisté vody, v označeném kvadrantu hned u kříže, s polarizačním kroužkem, obj 10
3.a	syntetický ceramid rozetřený v kapce ultra čisté vody, v označeném kvadrantu hned u kříže, s polarizačním kroužkem, obj. 10
3.b	viz. preparát 3.a, obj.20
4.a	cholesterol a přírodní ceramid v poměru 1:1 (připraveno na odparce) rozetřený v kapce ultra čisté vody, v označeném kvadrantu hned u kříže, s polarizačním kroužkem obj.10
4.b	viz. preparát 4.a, obj.20
5.a	cholesterol a syntetický ceramid v poměru 1:1 ( připraveno na odparce), rozetřeno v kapce ultra čisté vody, v označeném kvadrantu hned u středu kříže, s polarizačním kroužkem, obj.10
5.b	viz. preparát 5.a, obj.20
6.a	cholesterol, syntetický ceramid, kyselina olejová v poměru 4:8:1 (připraveno na odparce),rozetřeno v kapce ultra čisté vody, v označeném kvadrantu hned u kříže, s polarizačním kroužkem, obj.10
6.b	viz. preparát 6.a, obj 20
7.a	cholesterol a voda( 95%), po 12 cyklech na ultrazvukové lázni v označeném kvadrantu hned u středu kříže, s polarizačním kroužkem, obj.10
7.b	viz. preparát 7.a, obj.20
8.a	syntetický ceramid a voda ( 95%), po 12 cyklech na ultrazvukové lázni, v označeném kvadrantu hned u středu kříže, s polarizačním kroužkem, obj.10
8.b	viz. preparát 8.a, obj 20
9.a	cholesterol a syntetický ceramid v poměru 1:1(připraveno na odparce),voda (95%), po 12 cyklech na ultrazvukové lázni, v označeném kvadrantu hned u středu kříže, s polarizačním kroužkem, obj.10
9.b	viz. preparát 9.a, obj.20
10.a	cholesterol, syntetický ceramid, kys.olejová v poměru 4:8:1(připraveno na odparce), voda (95%), po 6 cyklech na ultrazvukové lázni v označeném kvadrantu, hned u středu kříže, s polarizačním kroužkem, obj.10
10.b	viz. preparát 10.a, obj20
11.a	cholesterol, přírodní ceramid v poměru 1:1(připraveno na odparce), voda 95%, po 6 cyklech na třepačce, v označeném kvadrantu hned u středu kříže,obj.10
11.b	viz. preparát 11.a, obj.20
12.a	cholesterol a voda (95%), po 6cyklech na třepačce, v označeném kvadrantu hned u středu kříže, s polarizačním kroužkem,obj.10

12.b	viz. preparát 12.a, obj.20
13.a	cholesterol, syntetický ceramid v poměru 1:1 (připraveno na odparce), voda 95%, po 6 cyklech na třepačce, v označeném kvadrantu hned u středu kříže, s polarizačním kroužkem, obj.10, pozn. vznikl tvrdý precipitát
13.b	viz. preparát 13.a, obj.20
14.a	cholesterol, syntetický ceramid, kys. olejová v poměru 4:8:1 (připraveno na odparce), voda 95%, po 6 cyklech na třepačce, v označeném kvadrantu hned u středu kříže, s polarizačním kroužkem, obj.10, pozn. vznikl méně pevný precipitát
14.b	viz. preparát 14.a, obj.20
15.a	cholesterol, syntetický ceramid v poměru 1:5 (připraveno na odparce), voda 95%, po 12 cyklech na ultrazvukové lázni, v označeném kvadrantu hned u středu kříže, s polarizačním kroužkem, obj.10
15.b	viz. preparát 15.a, obj.20

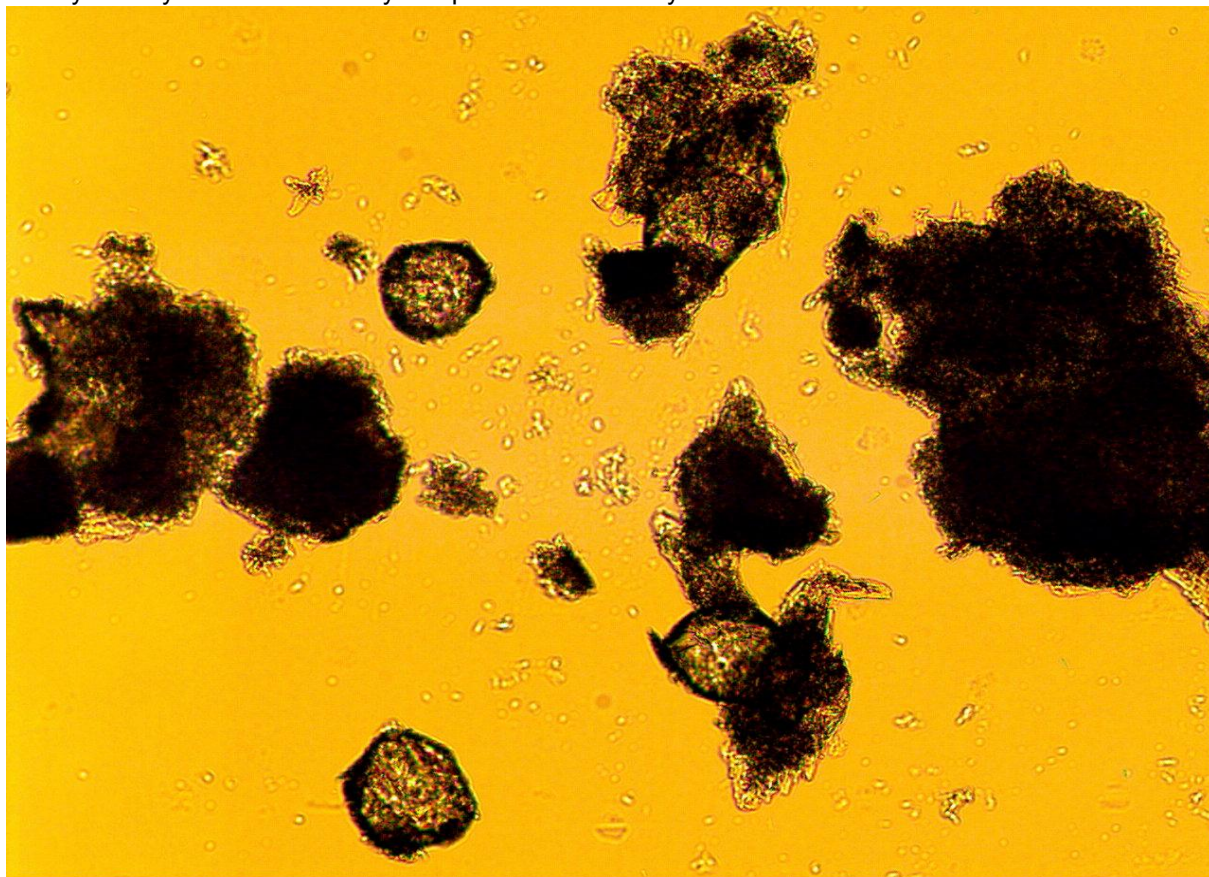
1.a Bezvodý cholesterol rozetřený v kapce ultra čisté vody



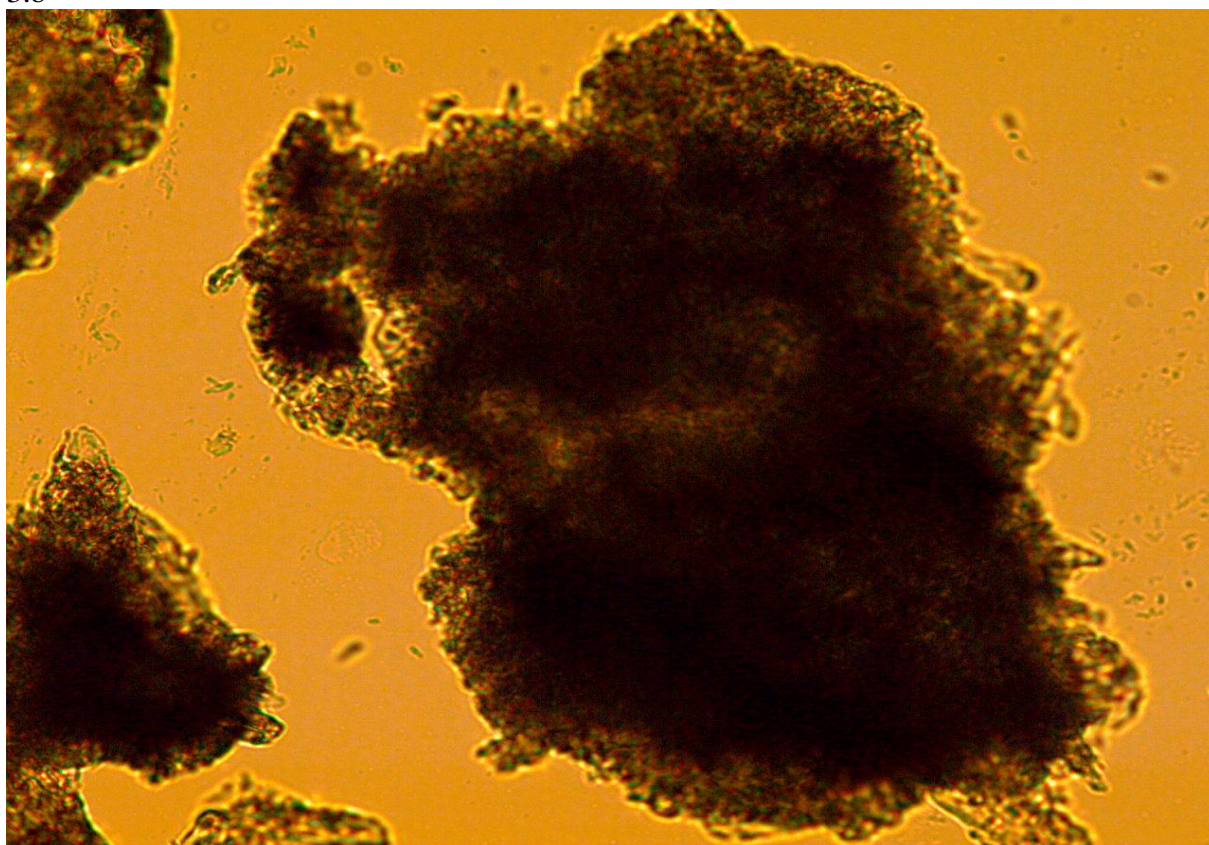
2.a Přírodní ceramid rozetřený v kapce ultra čisté vody



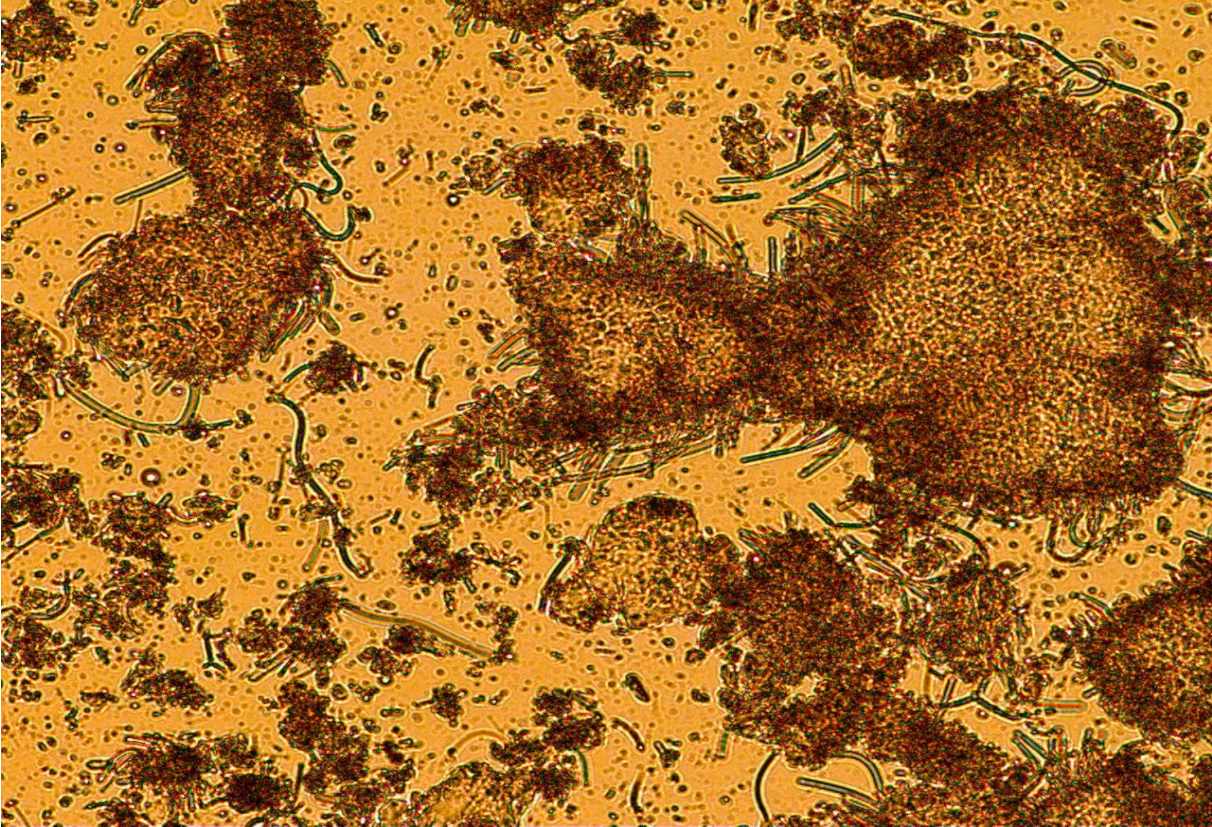
3.a Syntetický ceramid rozetřený v kapce ultra čisté vody



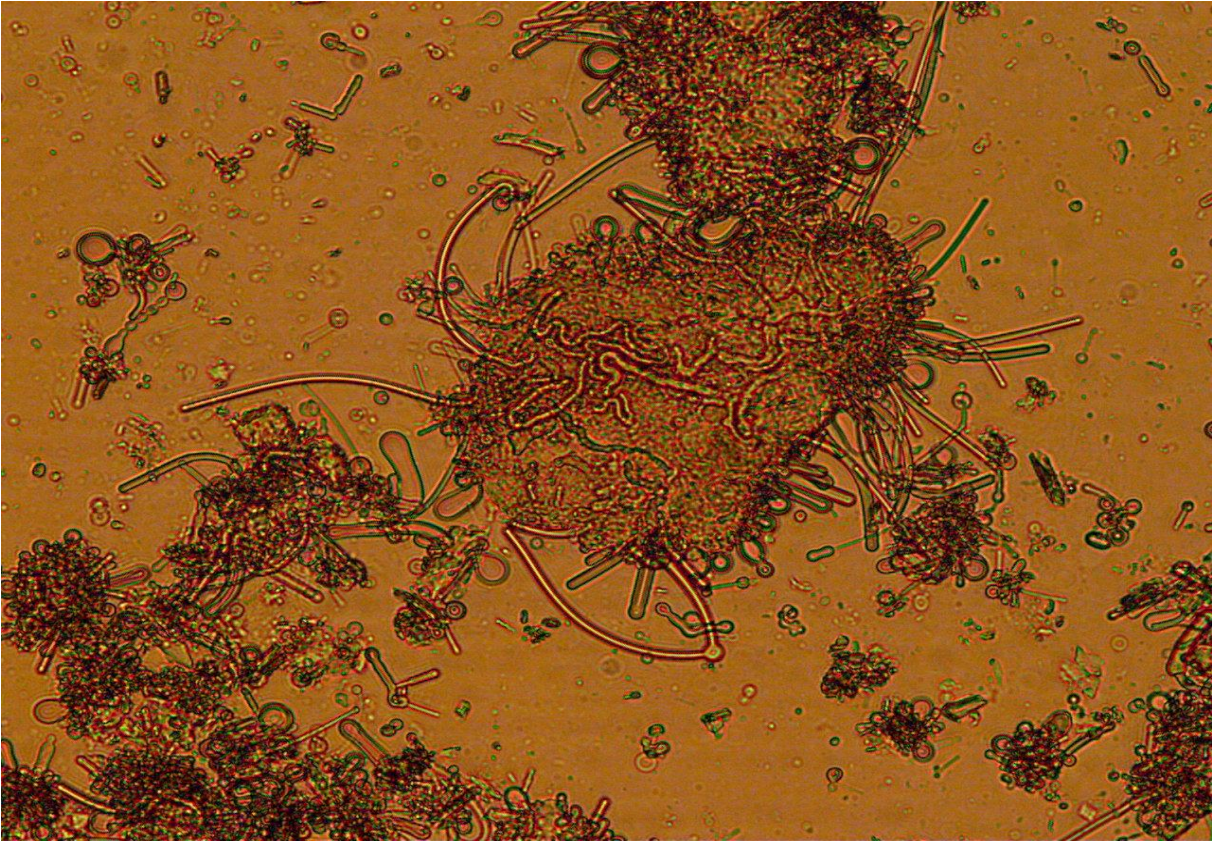
3.b



4.a Směs cholesterolu a přírodního ceramid v poměru 1:1, rozetřeno v kapce ultra čisté vody

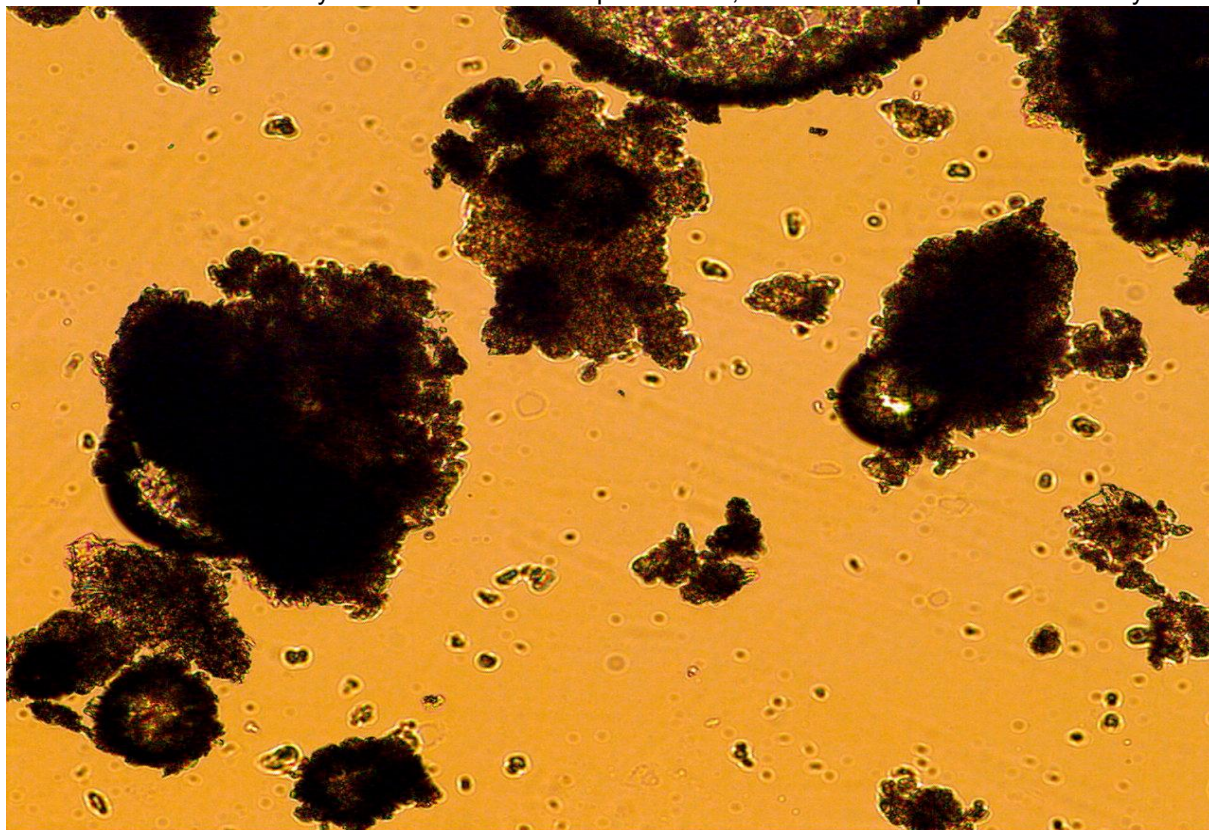


4.b

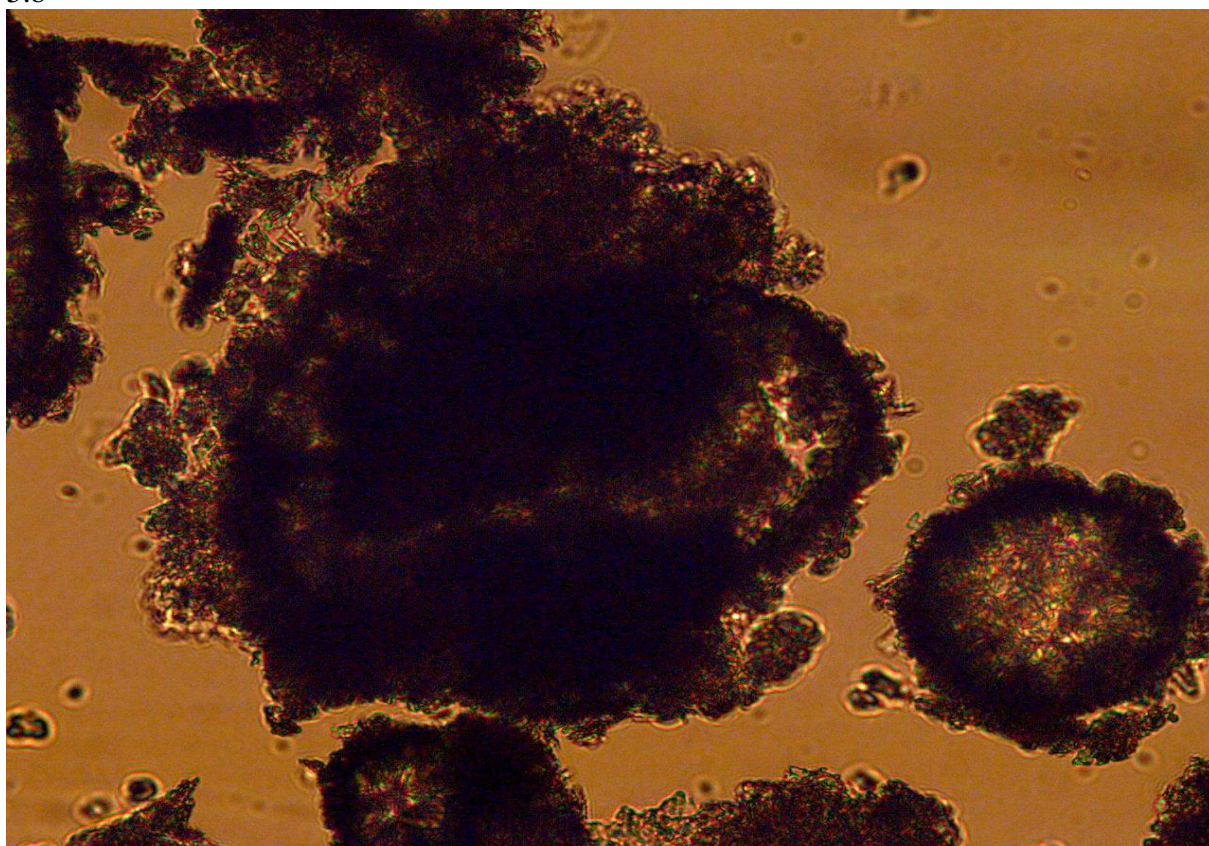




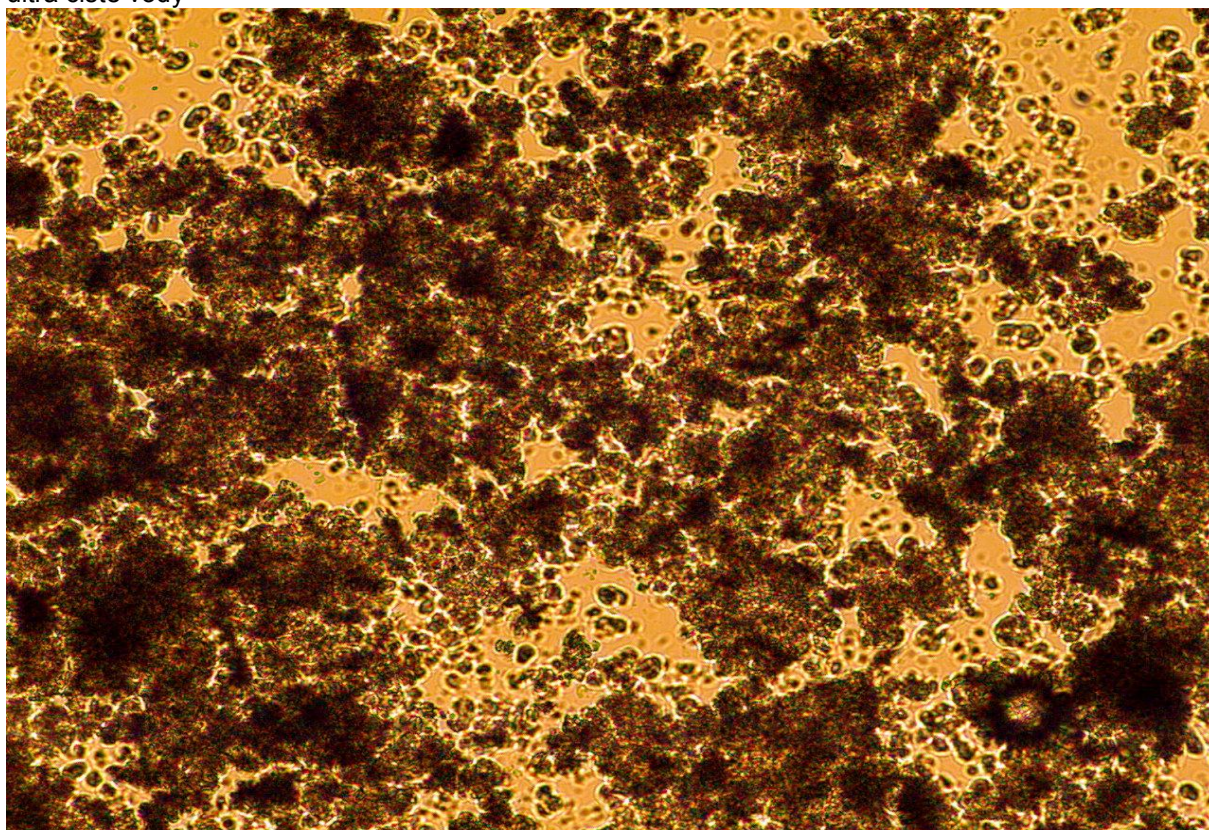
5.a Směs cholesterolu a syntetického ceramidu v poměru 1:1, rozetřeno v kapce ultra čisté vody



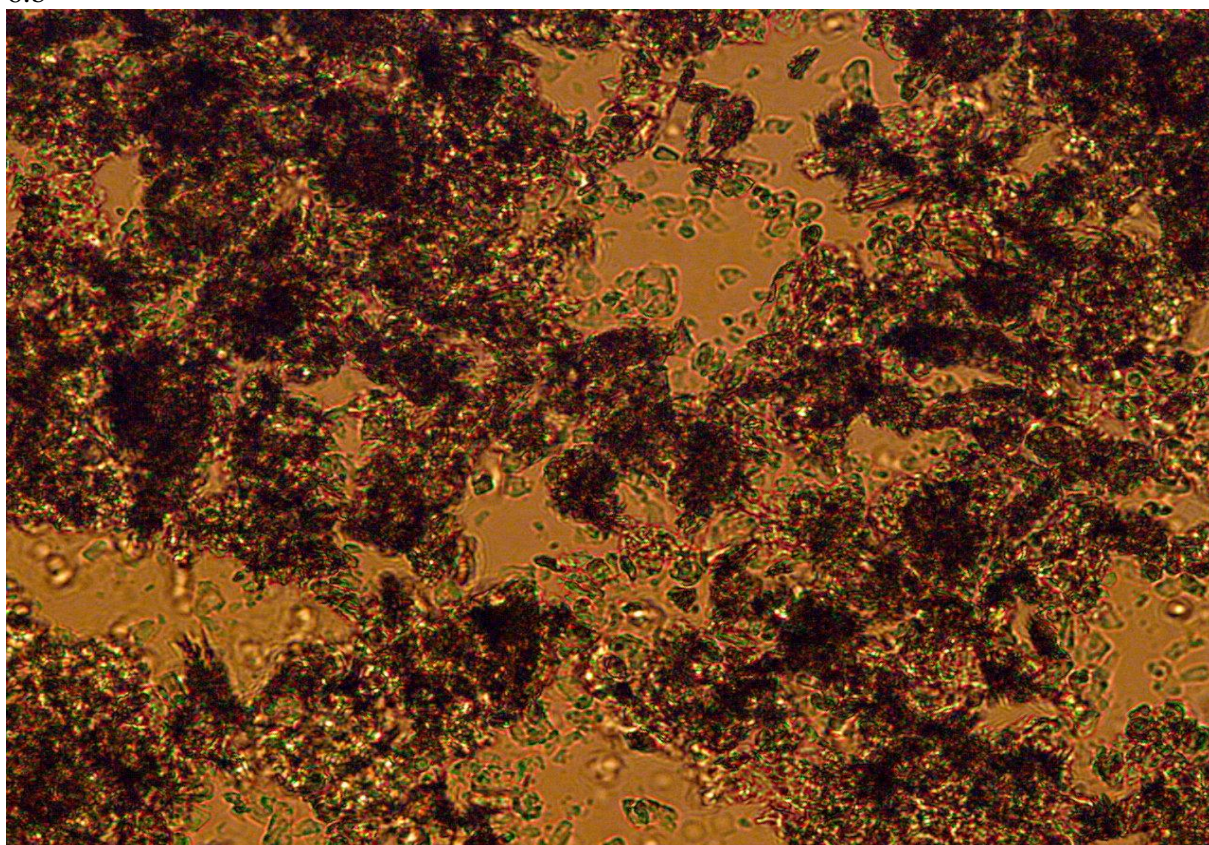
5.b



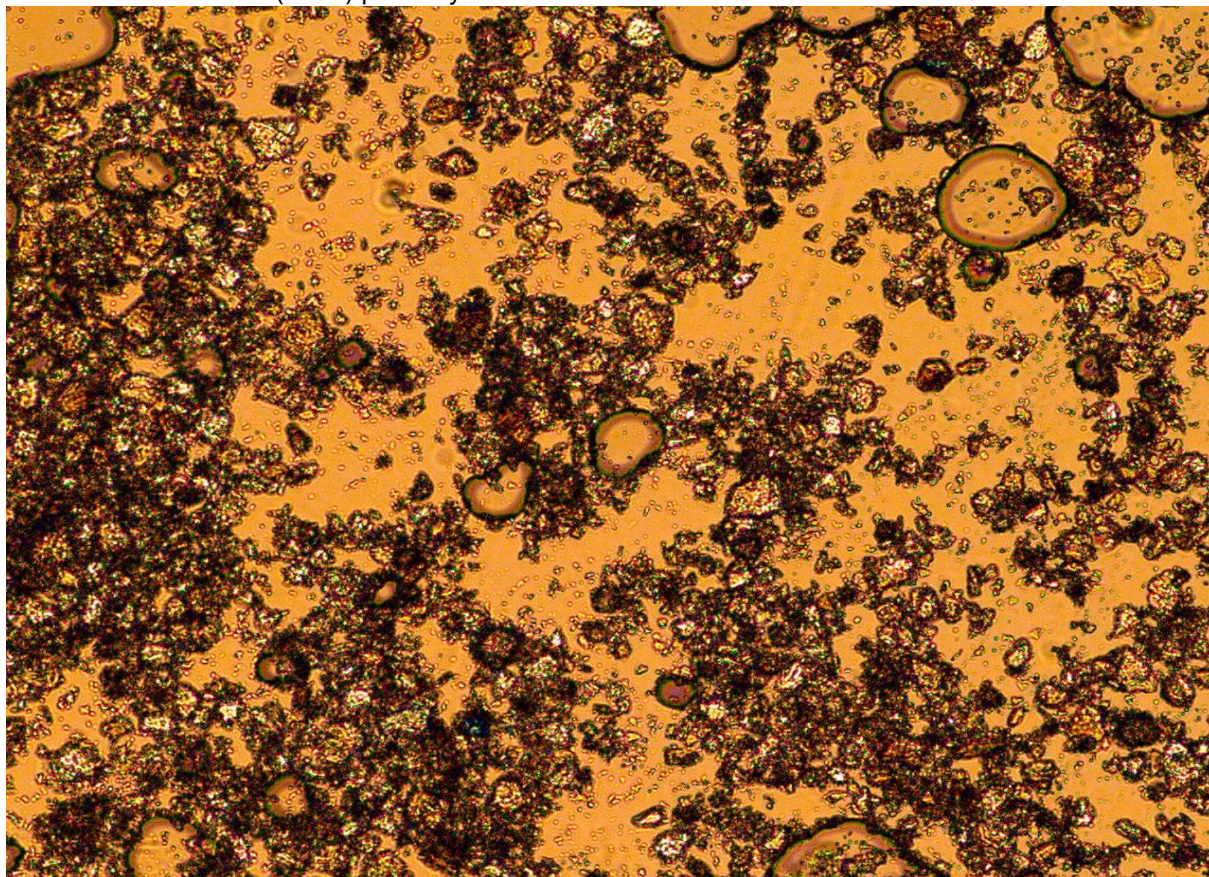
6.a Směs cholesterolu, syntetického ceramidu, kyseliny olejové v poměru 4:8:1, rozetřeno v kapce ultra čisté vody



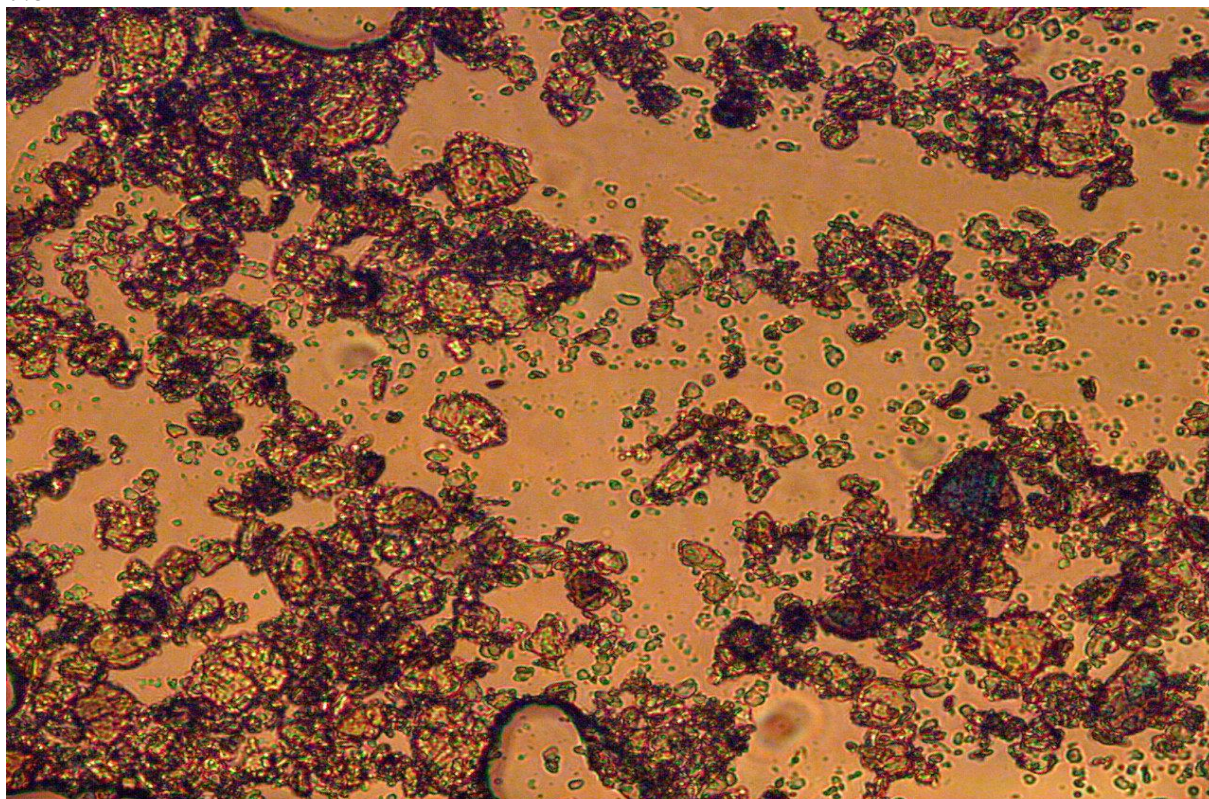
6.b



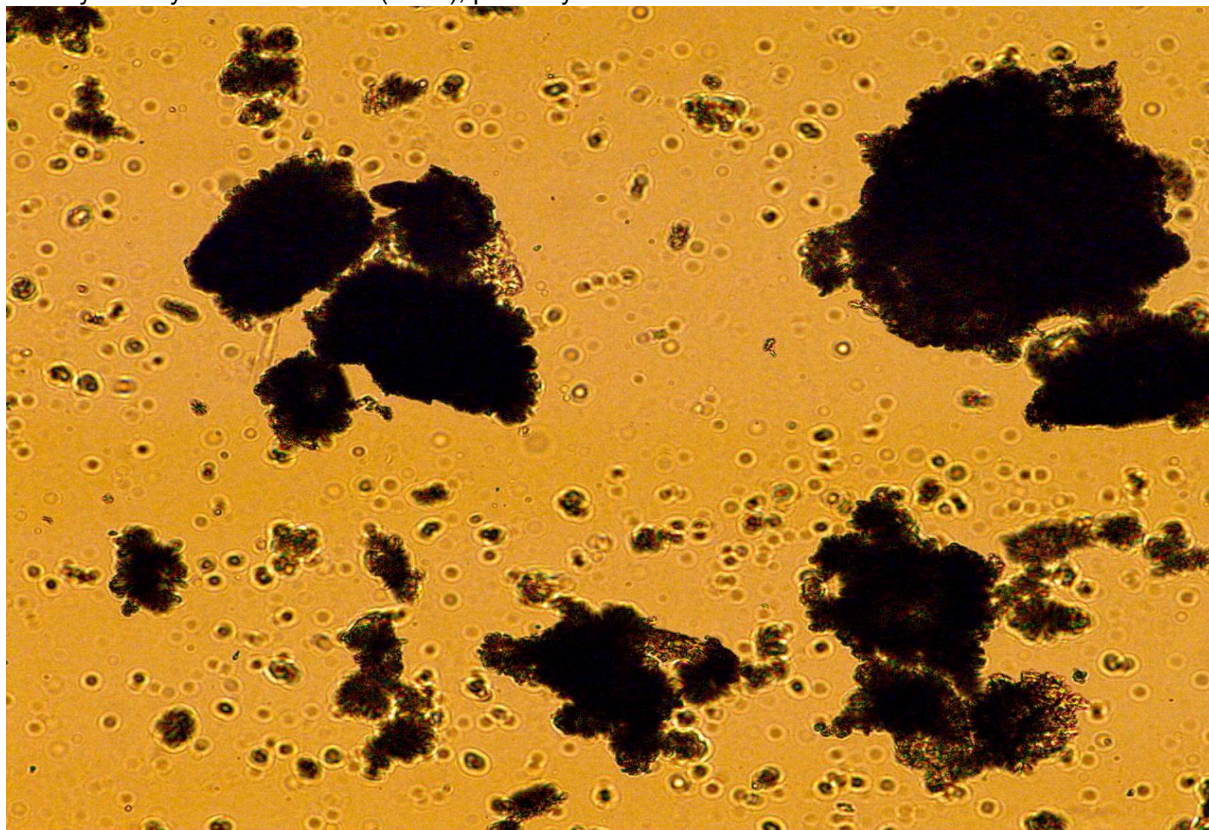
7.a Cholesterol a voda( 95%) po 12 cyklech na ultrazvukové lázni



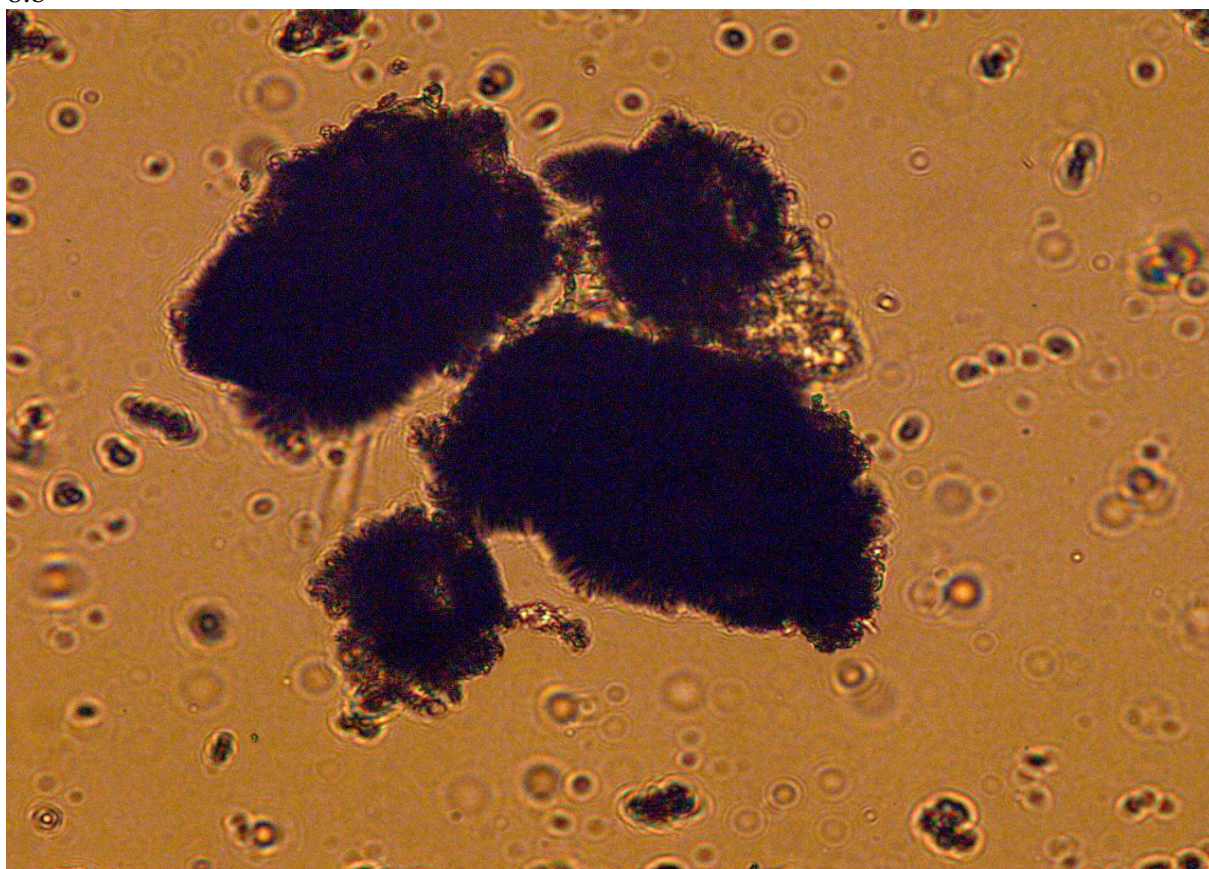
7.b



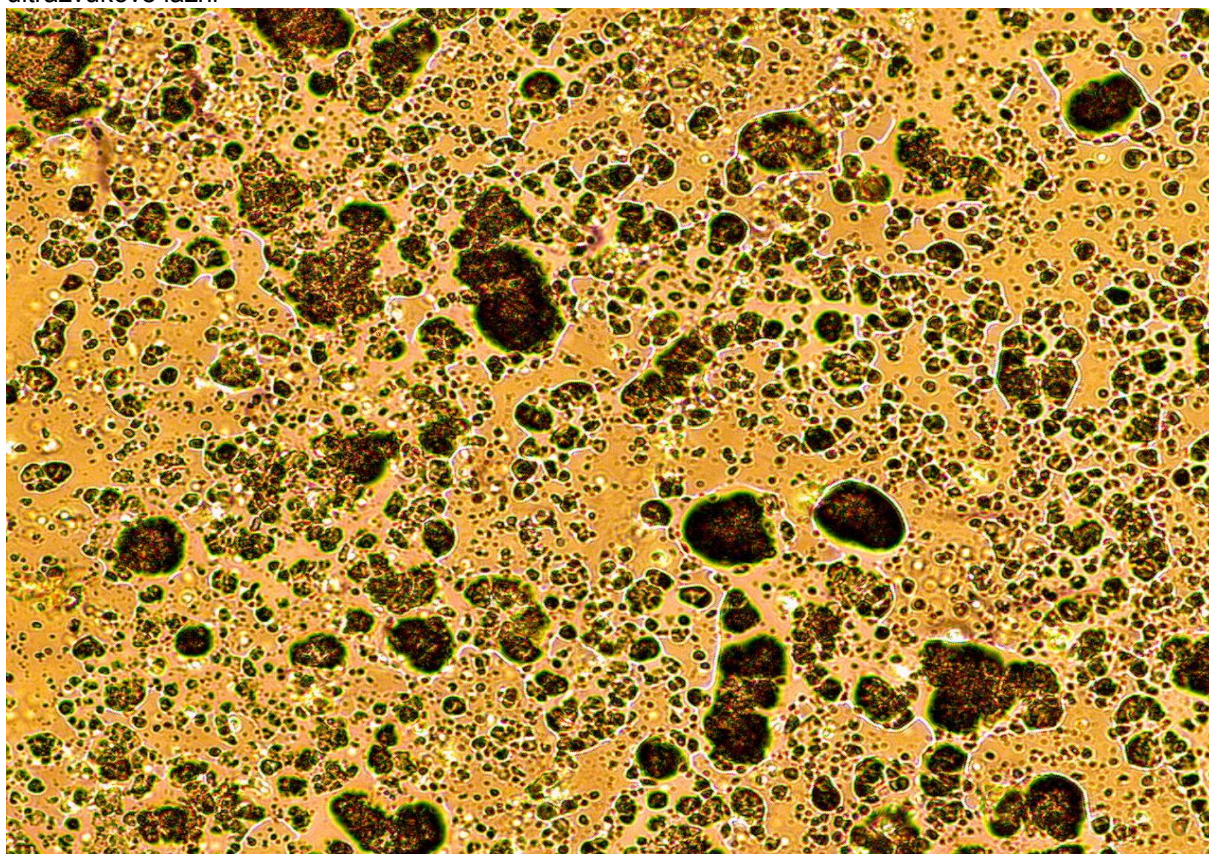
8.a Syntetický ceramid a voda ( 95%), po 12 cyklech na ultrazvukové lázni



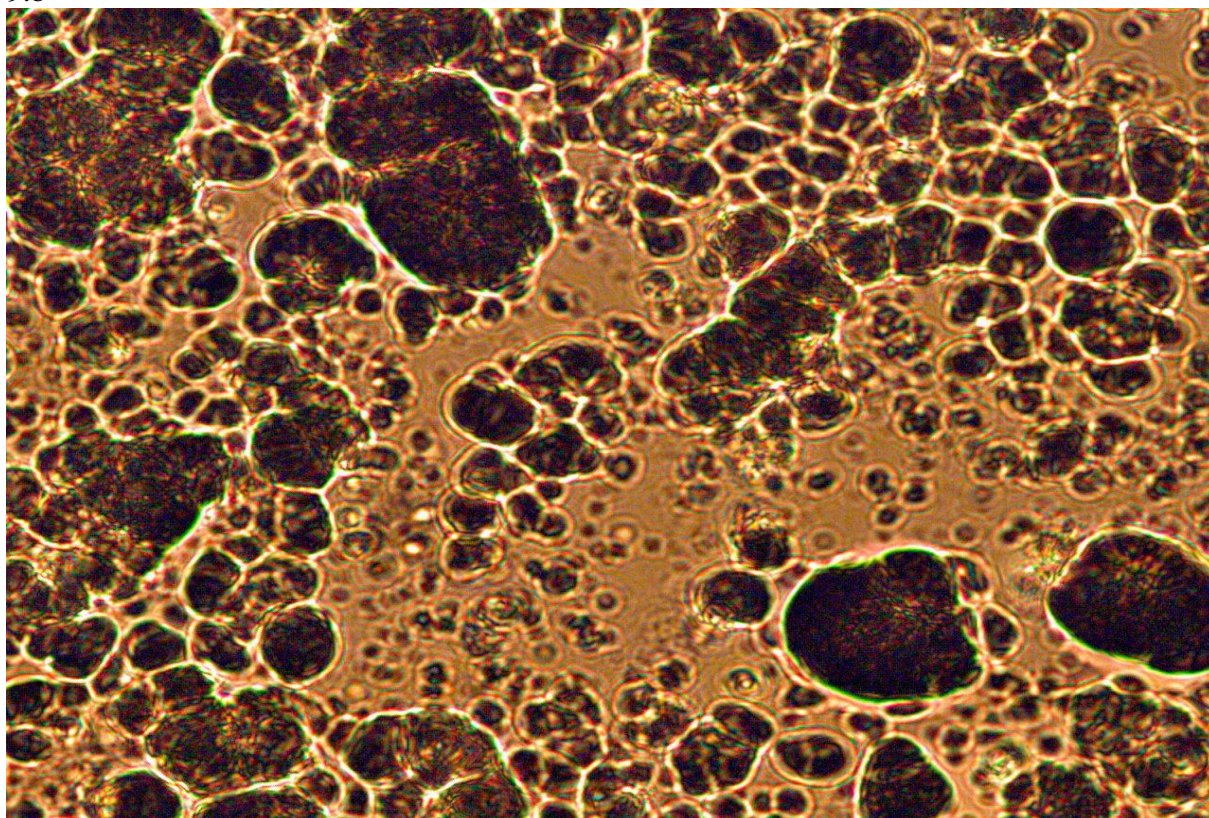
8.b



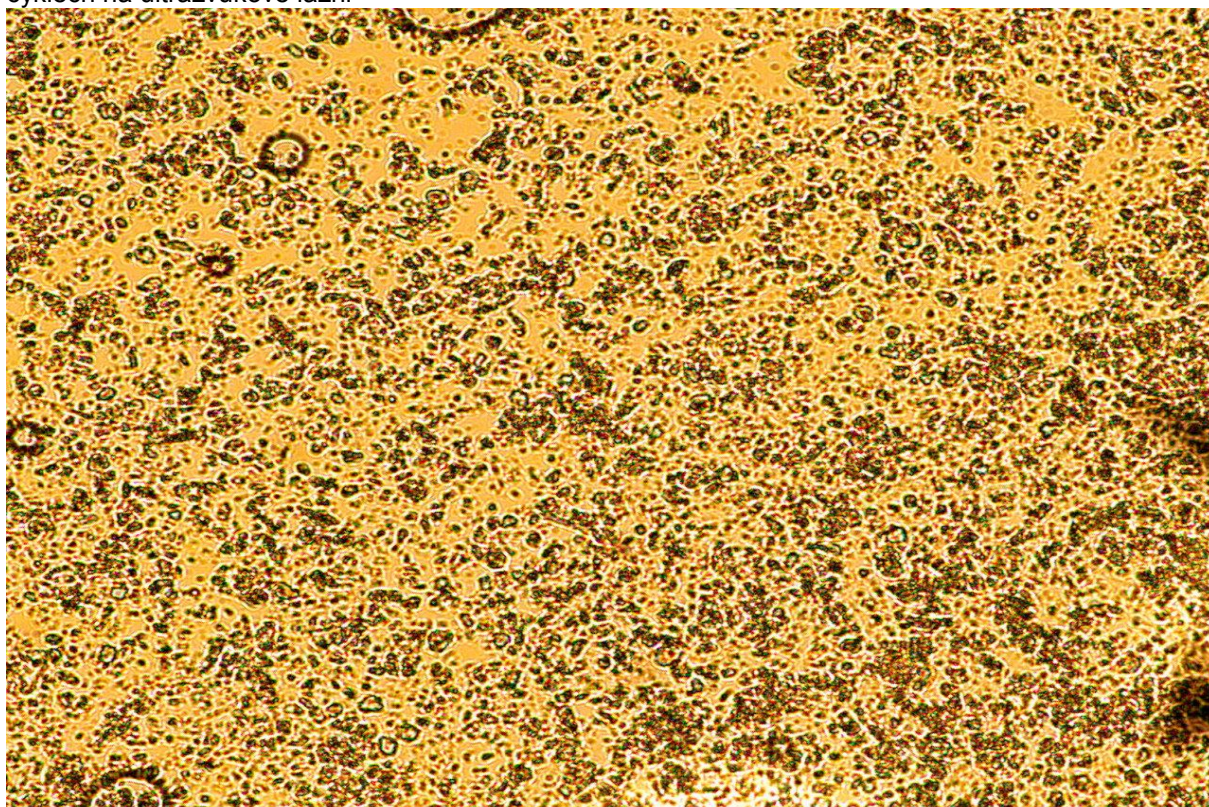
9.a Směs cholesterolu a syntetického ceramidu v poměru 1:1, voda (95%), po 12 cyklech na ultrazvukové lázni



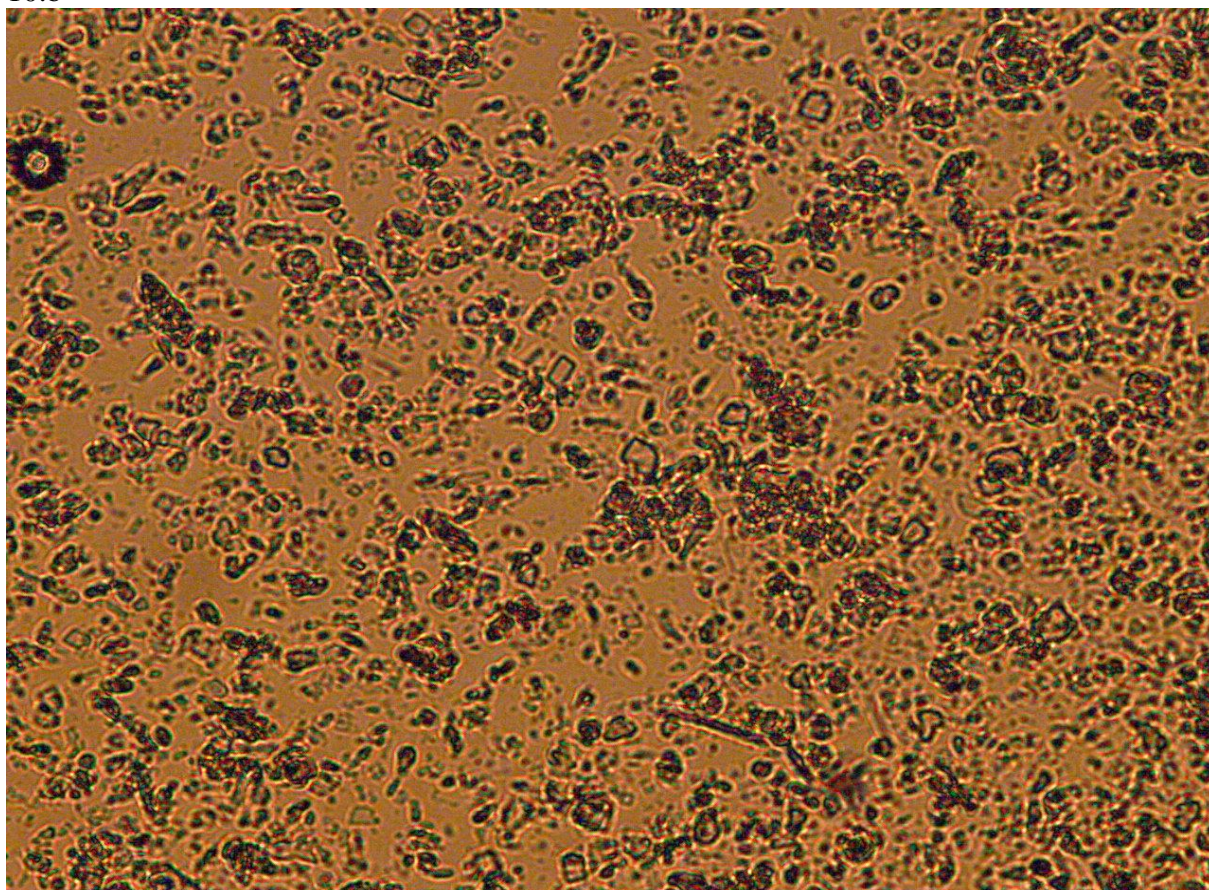
9.b



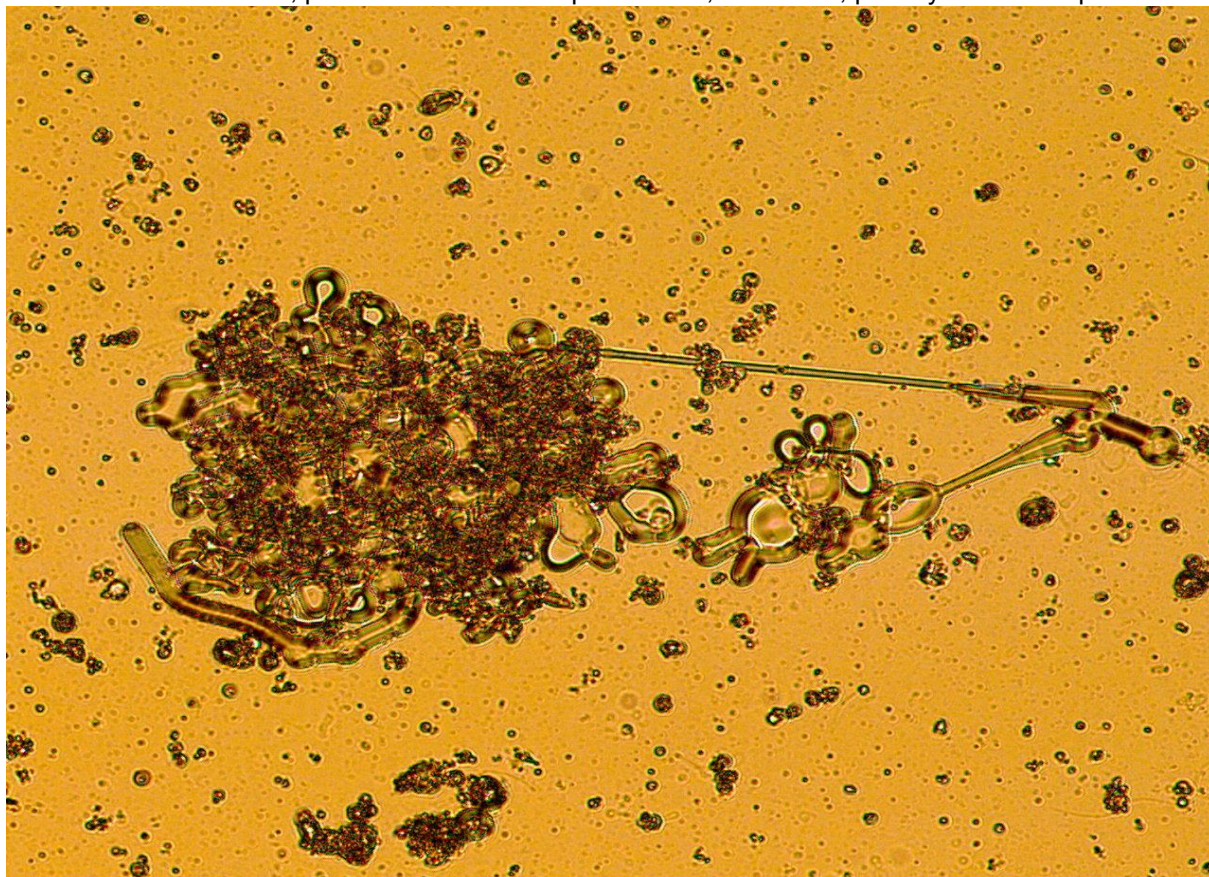
10.a Směs cholesterolu, syntetického ceramidu, kyseliny olejové v poměru 4:8:1, voda (95%), po 6 cyklech na ultrazvukové lázni



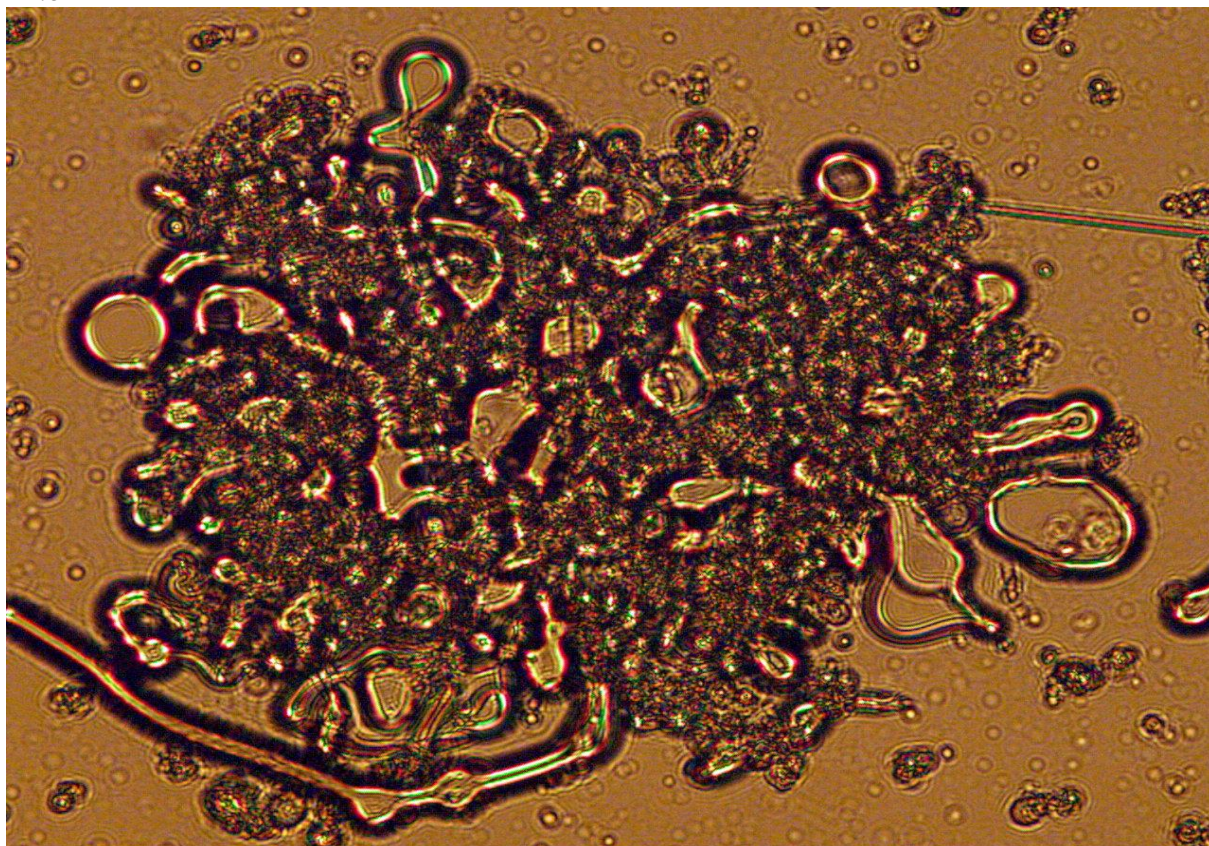
10.b



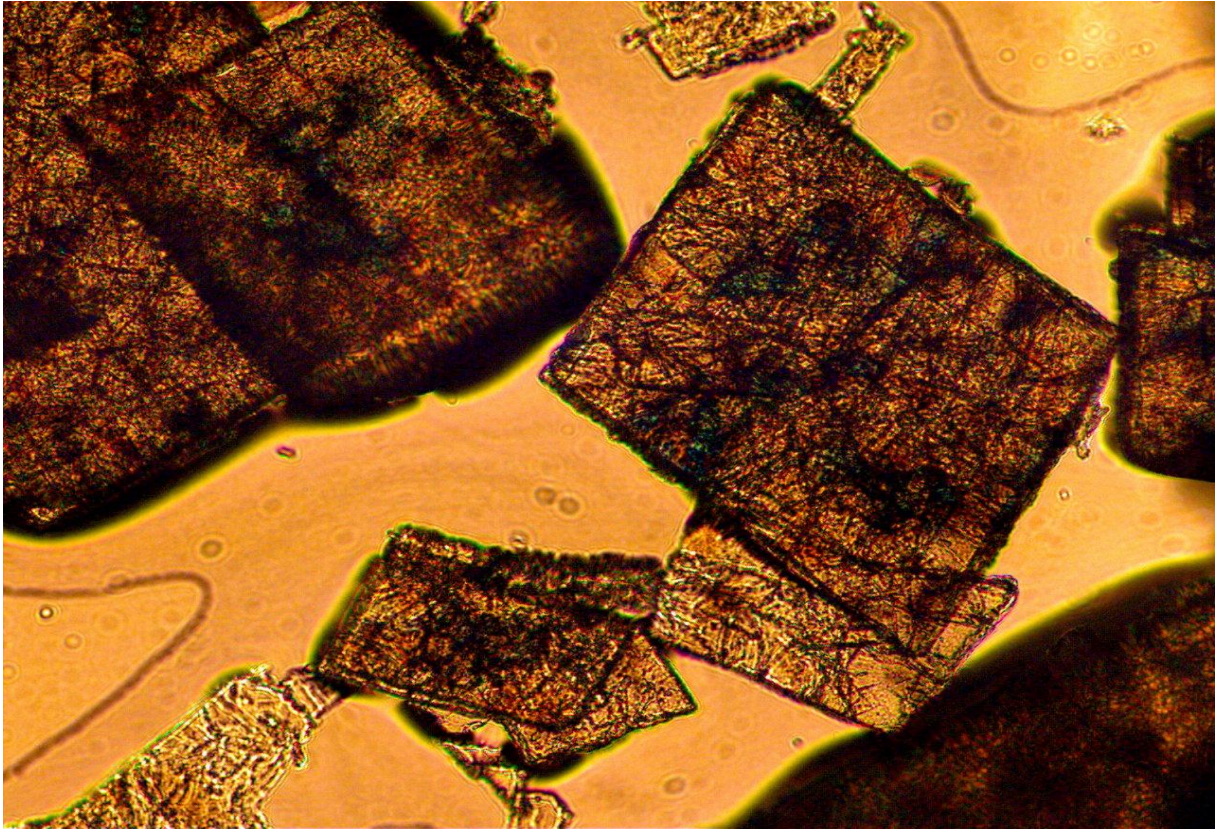
11.a Směs cholesterolu, přírodního ceramidu v poměru 1:1, voda 95%, po 6 cyklech na třepačce



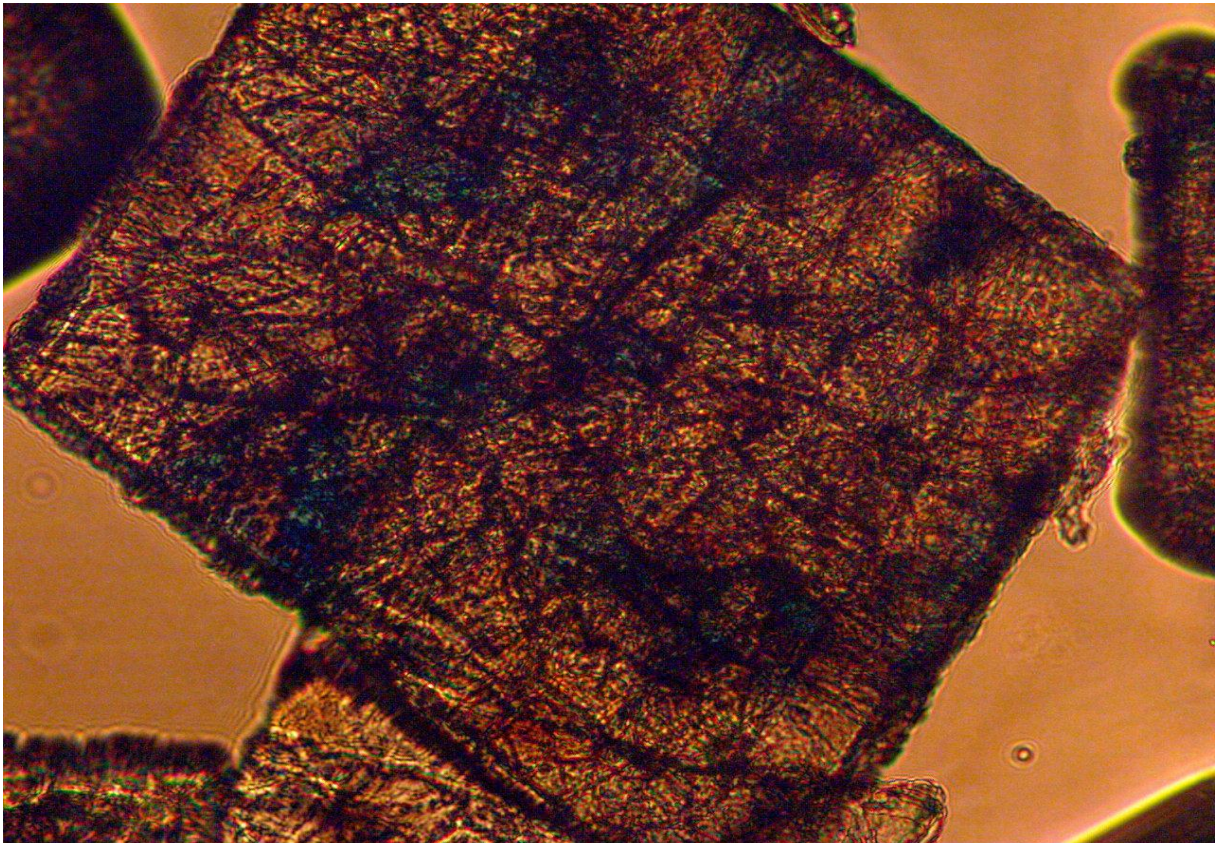
11.b



12.a Cholesterol a voda (95%), po 6cyklech na třepačce

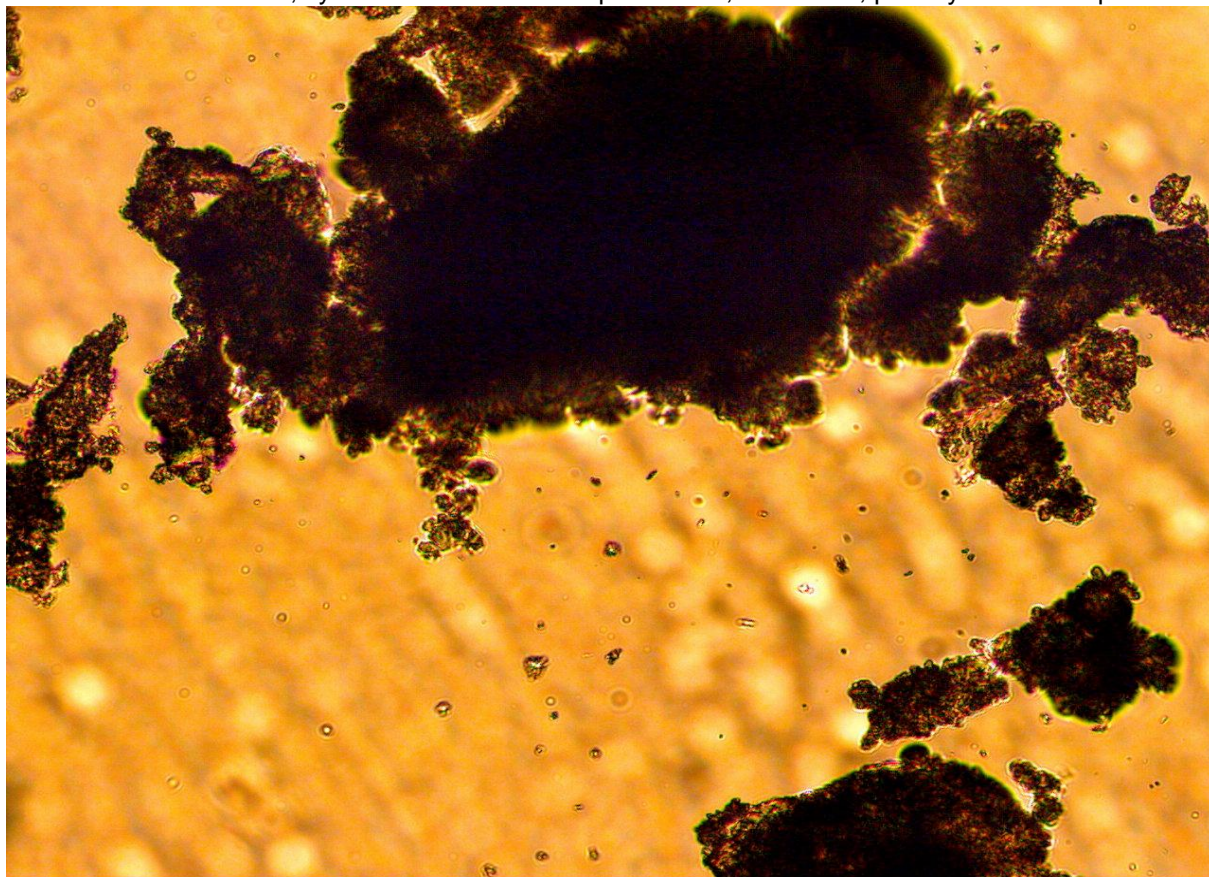


12.b

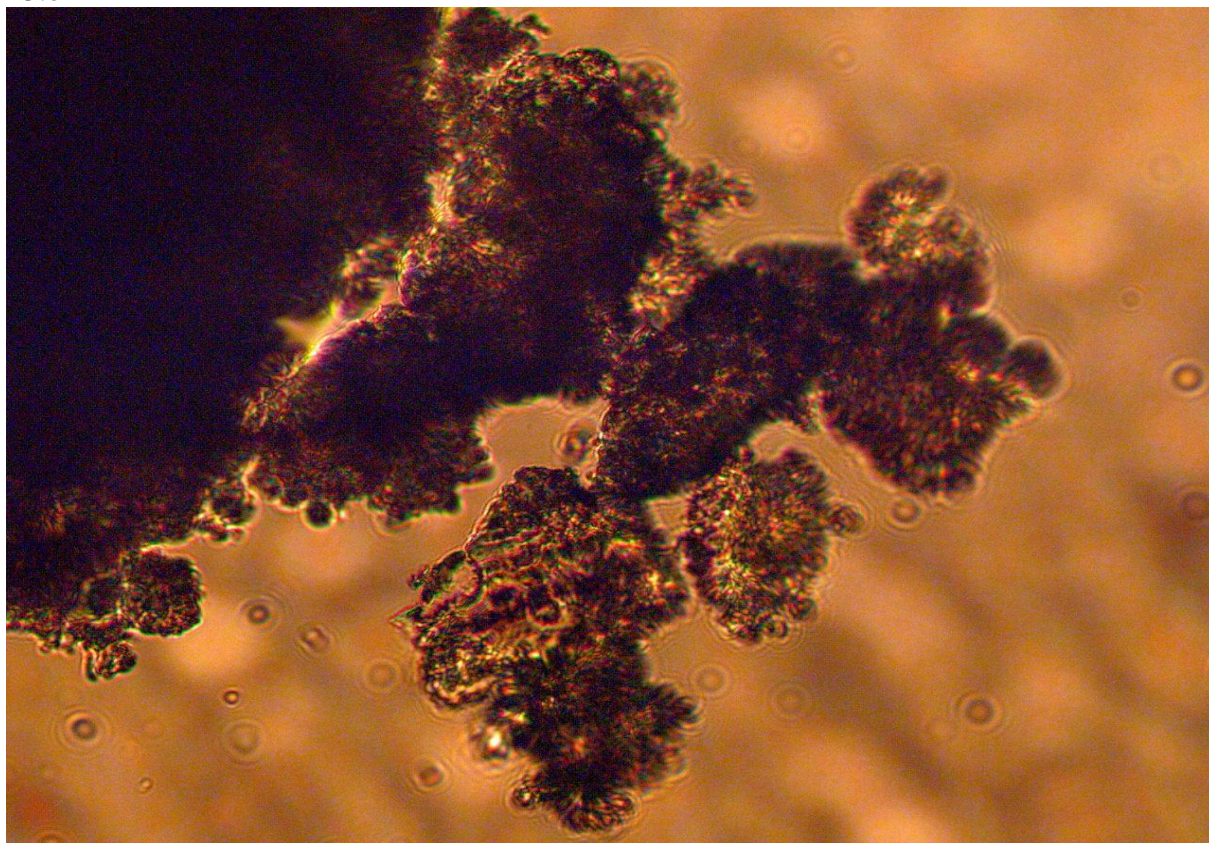




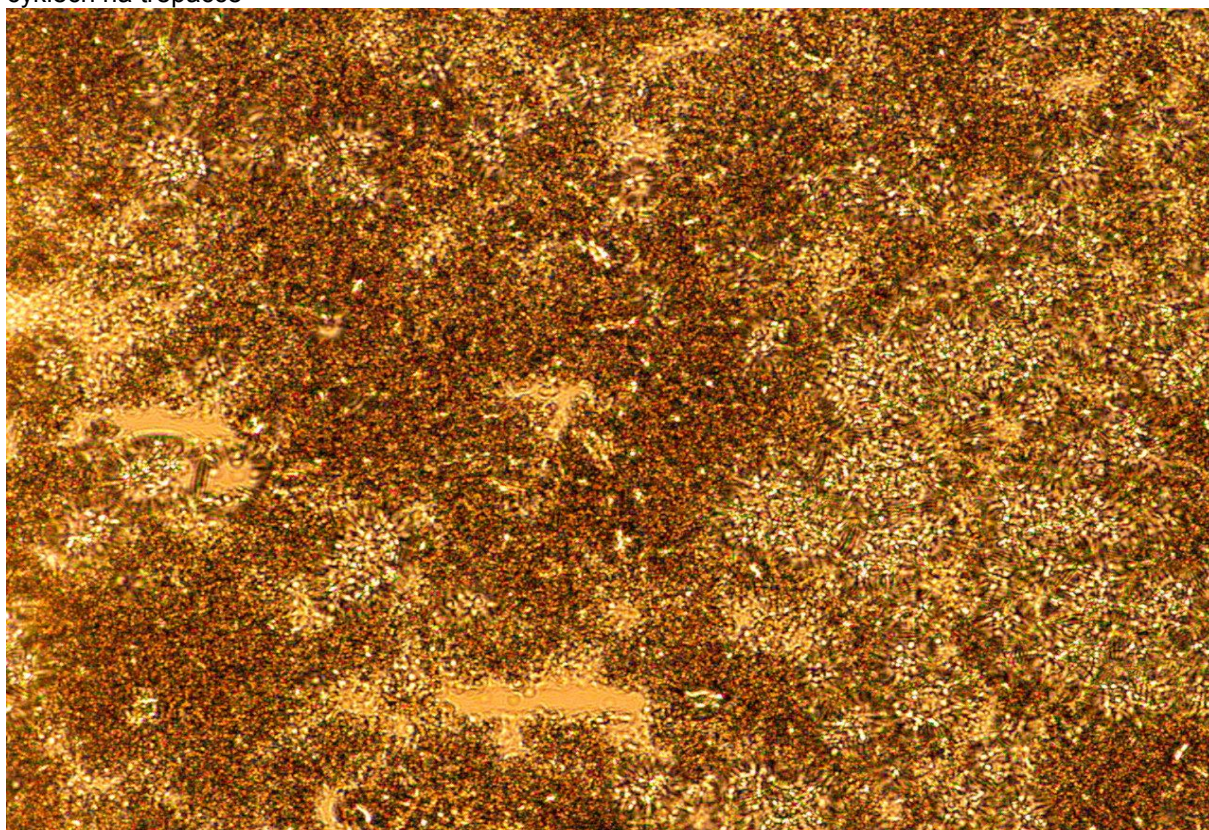
13.a Směs cholesterolu, syntetického ceramidu v poměru 1:1, voda 95%, po 6 cyklech na třepačce



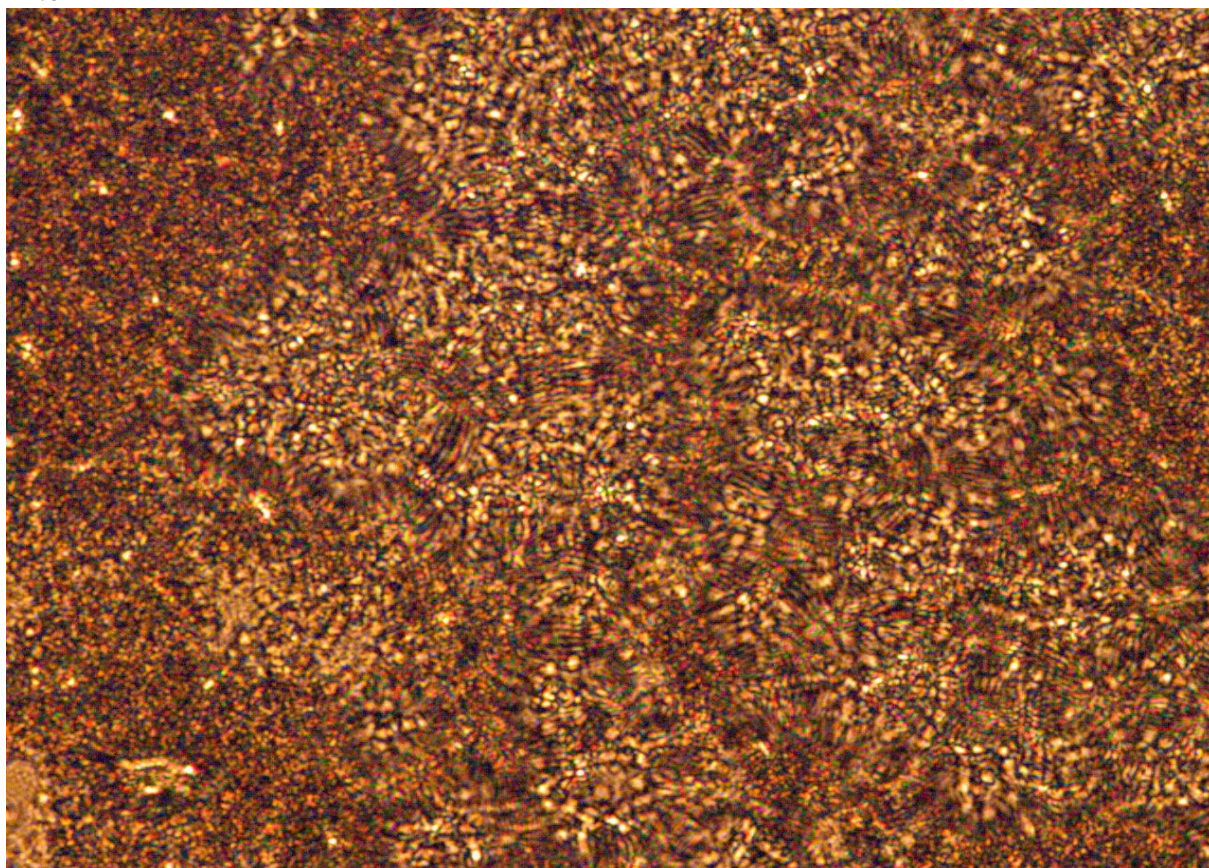
13.b



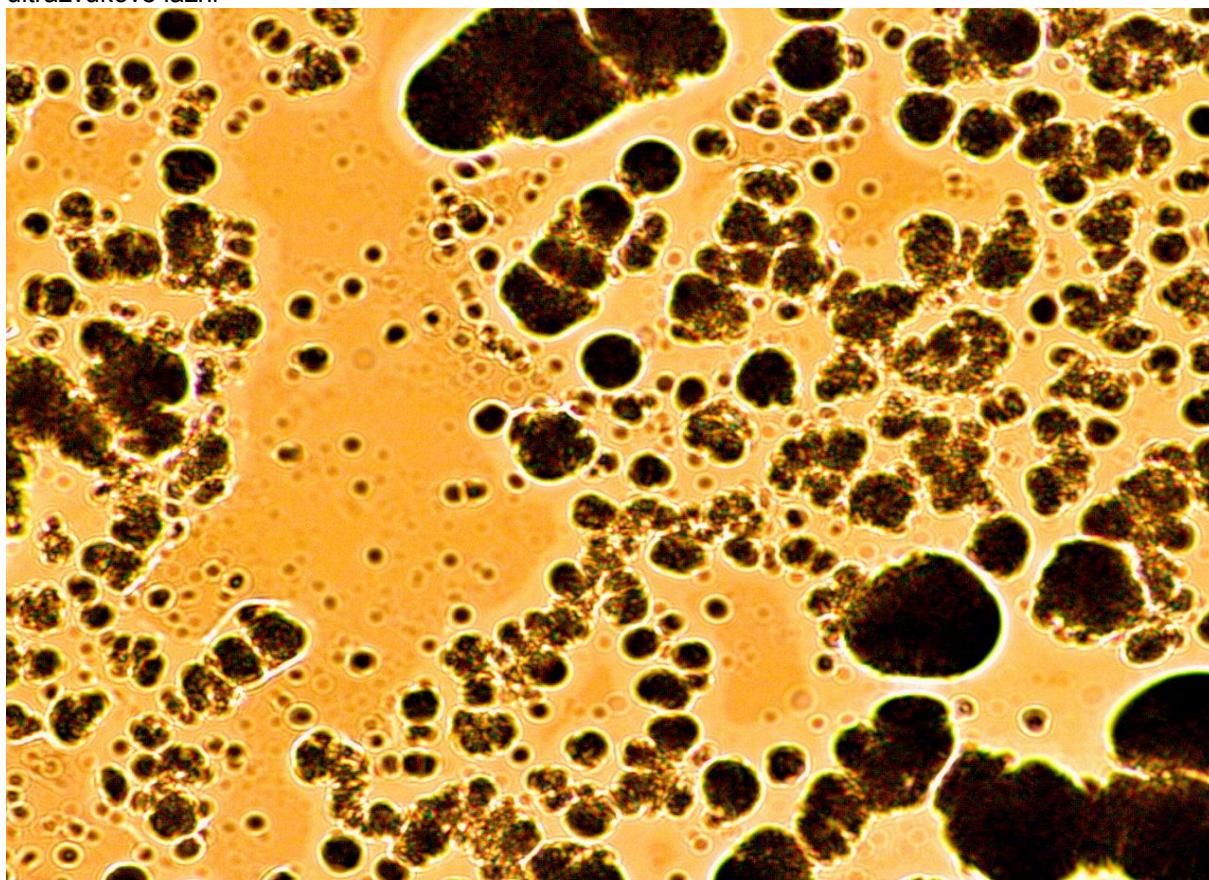
14.a Směs cholesterolu, syntetického ceramidu, kyseliny olejové v poměru 4:8:1, voda 95%, po 6 cyklech na třepačce



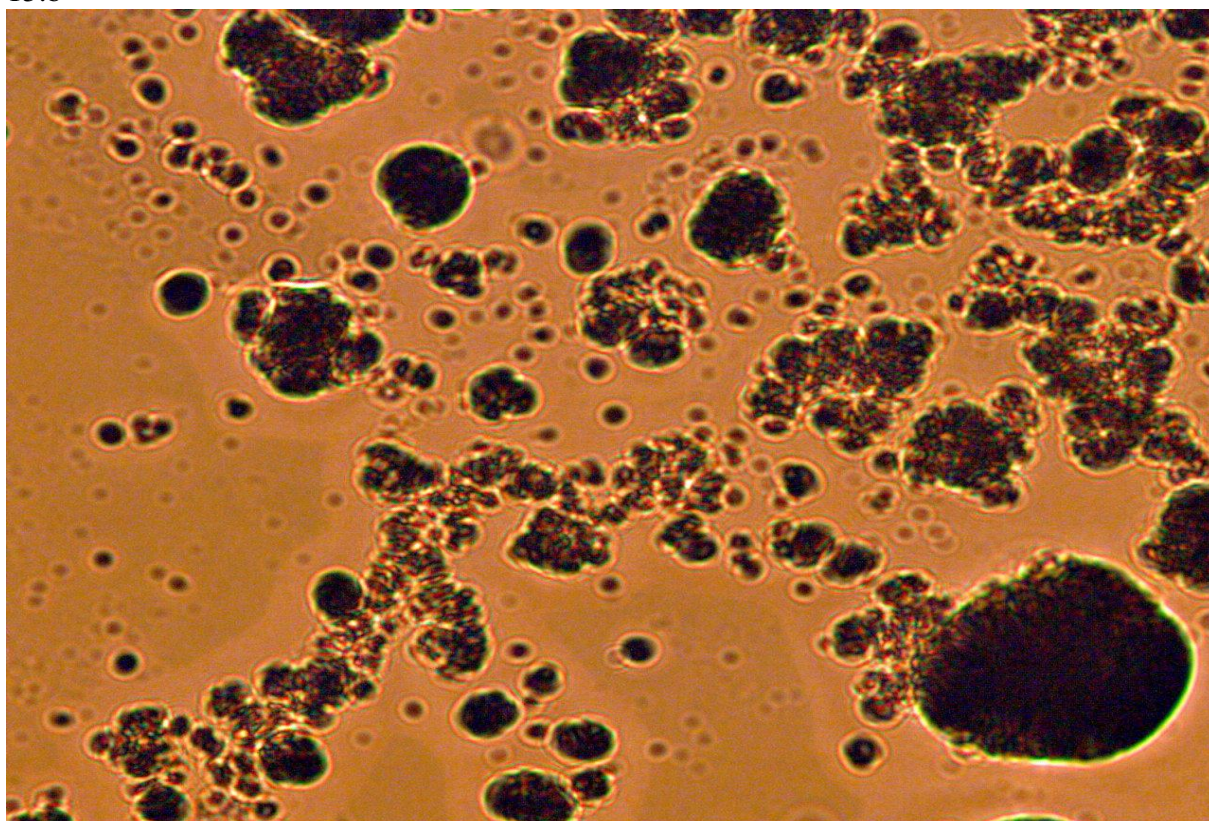
14.b



15.a Směs cholesterolu, syntetického ceramidu v poměru 1:5, voda 95%, po 12 cyklech na ultrazvukové lázni



15.b



## 3.6 Diskuze

### 3.6.1 Hodnocení DSC záznamů cholesterolu

Na grafu č.1 a), b) je hodnoceno chování bezvodého cholesterolu. Při prvním ohřevu vzorku jsou na záznamu viditelné dvě endotermní přeměny: polymorfní krystalická přeměna bezvodého cholesterolu při teplotě 45°C a přeměna z krystalické na kapalnou fázi při teplotě 151,1°C. U druhého ohřevu dochází k mírnému posunu píků k nižším teplotám, a to na 33,6°C a 150,1°C.

Na grafech č.2, 3, 4 hodnotíme chování hydratovaného cholesterolu. K hydrataci jsme využívali ultrazvukovou lázeň (graf č.2, 3) nebo třepačku (graf č.4). Vzorky se liší nejen použitým způsobem hydratace, ale důležitou roli zde hraje doba inkubace. Neboť vznik cholesterolu monohydrátu z bezvodého cholesterolu v nadbytku vody je také závislý na době stání vzorku. Na rozdíl od DSC záznamu bezvodého cholesterolu se u těchto vzorků objevují při prvním ohřevu 3 až 4 endotermní přeměny.

Na grafu č.2 a) je záznam prvního ohřevu hydratovaného cholesterolu po 6 cyklech na ultrazvukové lázni. Objevují se zde 4 píky. První pík je při teplotě 77,4°C, kdy cholesterol monohydrát ztrácí vodu a přechází polymorfní přeměnou na bezvodý cholesterol (viz. literatura 18). Druhý výrazný pík je na záznamu při 102,8°C, tento pík se v jiné literatuře nevyskytuje, kromě jedné studie (viz. literatura 18), kde se při měření samotného cholesterolu a cholesterolu ve směsích rychlostí 2°C/min vyskytuje přeměna při 96°C, a to u vzorků které prošly rychlejší inkubací a za vyšších teplot. Mohlo by se jednat o další formu cholesterolu monohydrátu, který ztrácí vodu při 102,8°C a přeměňuje se na bezvodý cholesterol. Tato druhá přeměna se stáním vzorku posouvá k nižším teplotám. Hodnota entalpie tohoto píku je u vzorku po 6 cyklech hydratace na ultrazvukové lázni 35,300 J/g a po 12 cyklech na ultrazvukové lázni se snižuje na 12,300 J/g. Třetí pík je při teplotě 122,8°C, dochází k přechodu bezvodého cholesterolu v přítomnosti nadbytku vody na fázi kapalných krystalů ve smektickém stavu. Fáze kapalných krystalů je stabilní v teplotním rozmezí od 122,8°C do 155,0°C. Čtvrtou přeměnou je tání cholesterolu a vznik kapaliny při 155,0°C.

Na grafu č.2. b) je záznam druhého ohřevu. Objevují se zde 3 endotermní přeměny: při 94,2 °C, mohlo by se jednat o přeměnu cholesterolu monohydrátu na bezvodý cholesterol, při 121,4°C dochází k vytvoření fáze kapalných krystalů a při 155,1°C cholesterol taje a mění se na kapalinu. U všech následujících vzorků, lišících se způsobem hydratace a dobou stání, jsou u druhého ohřevu tyto 3 přeměny teplotně téměř shodné (hodnoty teplot a tepel tání jsou přehledně uvedeny v tabulce č.1, 2).

Na grafu č.3 a) je záznam prvního ohřevu hydratovaného cholesterolu po 12 cyklech na ultrazvukové lázni. Objevují se zde 4 píky. Ve srovnání se záznamem prvního ohřevu vzorku hydratovaného cholesterolu po 6 cyklech na ultrazvukové lázni, došlo k posunu prvního píku na vyšší teplotu, a to ze 77,4°C na 81,3°C. Jedná se o uvolnění vody z cholesterolu monohydrátu. Druhá přeměna je při teplotě 102,1°C, došlo u ní k výraznému snížení entalpie

na 12,3 J/g. Třetí pík na záznamu 122,4°C je přeměnou bezvodého cholesterolu na fázi kapalných krystalů. K tání a vzniku kapaliny dochází při teplotě 155,2°C.

Na grafu č.3 b) je záznam druhého ohřevu. Objevují se zde 3 endotermní přeměny : při 94,0°C, při 121,3°C a při 155,3°C.

Na grafu č.3 d) je záznam opětovného měření vzorku č.3 hydratovaného cholesterolu po 12 cyklech na ultrazvukové lázni. Měření bylo provedeno po cca 5 měsících stání v uzavřeném vysokotlakém kelímku. Vzorek byl vychlazen na výchozí teplotu -60°C, na záznamu prvního ohřevu je výrazný pík tání volné vody při teplotě 9,1°C, další endotermní přeměny jsou teplotně srovnatelné s druhým ohřevem vzorku č.3 na grafu č.3. b), a to první při 94,4°C, druhá při 121,1°C a třetí při 155,2°C.

Na grafu č.4 a) je záznam prvního ohřevu hydratovaného cholesterolu po 6 cyklech na třepačce. Vzorek byl změřen po cca 11 měsících stání ve víálce při pokojové teplotě. Vlivem dlouhé doby inkubace při pokojové teplotě se nám na záznamu objevují pouze tři endotermní přechody: při 84,3°C dochází k uvolnění vody z cholesterolu monohydrátu, při 121,5°C vzniká z bezvodého cholesterolu v nadbytku vody fáze kapalných krystalů a při 154,6°C cholesterol taje a mění se na kapalinu.

Na grafu č.4 b) je záznam druhého ohřevu. Objevují se zde také 3 píky, které se teplotně téměř shodují se záznamy druhých ohřevů vzorků, u nichž byla k hydrataci cholesterolu využita ultrazvuková lázeň. První přeměna je při teplotě 94,1°C , druhá při 118,9°C a třetí při 154,3°C . Teploty a tepla tání vzorků č.1-4 jsou uvedeny v tabulkách č.1, 2.

### 3.6.2 Hodnocení DSC záznamů syntetického ceramidu

Na grafech č.5 a), b) je záznam syntetického ceramidu, u prvního ohřevu vzorku se objevuje jeden pík s  $T_i$  87,0°C, u druhého ohřevu dochází k mírnému snížení  $T_i$  na 82,4°C.

Na grafu č.6 je záznam vzorku syntetického ceramidu s ultra čistou vodou po 6 cyklech hydratace na ultrazvukové lázni. Na záznamu je opět viditelný jeden pík, jeho  $T_i$  se ve srovnání s bezvodým syntetickým ceramidem posunula na nižší hodnotu, a to při prvním ohřevu na 84,3°C, při druhém ohřevu na 75,3°C.

Na grafu č.7 je záznam vzorku syntetického ceramidu s ultra čistou vodou po 12 cyklech hydratace na ultrazvukové lázni. Objevuje se zde jeden pík, během prvního ohřevu při  $T_i$  84,0°C, během druhého ohřevu při  $T_i$  75,6°C.

Na grafech č.8 a), b) je srovnání vzorků syntetického ceramidu s ultra čistou vodou po 6 a 12 cyklech hydratace na ultrazvukové lázni. Píky jsou teplotně shodné, zvyšování počtu cyklů hydratace nemá na DSC záznam výrazný vliv.

Na grafu č.9 a) je záznam prvního ohřevu opakovaného měření vzorku hydratovaného syntetického ceramidu po 12 cyklech na ultrazvukové lázni, vzorek stál cca 5 měsíců v uzavřeném vysokotlakém kelímku při pokojové teplotě. Měření bylo provedeno s chlazením na výchozí teplotu -60°C. Na záznamu se objevuje, jako první ostrý pík tání volné vody při teplotě 2,0°C. Druhý pík je protáhlý s počátkem kolem 40°C a  $T_i$  68,8°C.

Na grafu č.9 b) je záznam druhého ohřevu. Opět je zde ostrý pík tání volné vody s  $T_t$  1,4°C, druhý pík se rozpadá na menší protáhlé píky v teplotní oblasti 30-80°C.

Dlouhá doba inkubace vzorku za pokojové teploty má vliv na DSC záznam vzorku, dochází k posunu píku k nižším teplotám. Teploty a tepla tání vzorků č.5-7 jsou uvedeny v tabulce č.3.

### 3.6.3 Hodnocení DSC záznamů směsí cholesterolu a syntetického ceramidu

Na grafu č.10 je záznam prvního a druhého ohřevu směsi cholesterolu a syntetického ceramidu v poměru 1:1. Při prvním ohřevu se objevuje endotermní pík při  $T_t$  83,6°C. Tento pík má ostrý nástup a postupně klesá v teplotním rozmezí 100-145°C. Z čehož usuzujeme, že dochází k interakci obou složek, ale směs není zcela homogenní. Na záznamu druhého ohřevu je viditelný náznak krystalizace při teplotě 52,8°C, dochází tedy pravděpodobně k vypadávání cholesterolu ze směsi. Cholesterol je schopen ve směsích vytvořit homogenní gelovou fázi jen do určitého množství, kdy dojde k jeho rozpuštění ve směsi. Přesáhne-li toto množství, dojde k vypadávání čistého krystalického cholesterolu (viz. literatura 31, 32). Druhý endotermní pík se objevuje při  $T_t$  75,3°C a třetí neostrý endotermní pík na záznamu je při  $T_t$  115,5°C.

Na grafu č.11 je záznam prvního a druhého ohřevu hydratované směsi cholesterolu a syntetického ceramidu v poměru 1:1 po 6 cyklech na ultrazvukové lázni. Během prvního ohřevu se objevuje jedna endotermní přeměna. Pík má maximum při  $T_t$  74,1°C a pozvolna klesá. U druhého ohřevu je na záznamu opět náznak krystalizace při teplotě 49,0°C a endotermní pík při teplotě 72,6°C. Hydratací směsi dochází k posunu teplot na nižší hodnoty, stále však nevzniká zcela homogenní směs.

Na grafu č.12 je záznam prvního a druhého ohřevu hydratované směsi cholesterolu a syntetického ceramidu v poměru 1:1 po 12 cyklech na ultrazvukové lázni. Při prvním ohřevu je viditelný táhlý pík v teplotním rozmezí 71-78°C, při druhém ohřevu dochází ke krystalizaci při 52,3°C a nástupu endotermní přeměny s maximem při  $T_t$  73,4°C. Zvyšování počtu cyklů hydratace vzorku na ultrazvukové lázni nemá na posun hodnot teplot výrazný vliv.

Na grafech č.13 a), b), č.14 a), b) je porovnání záznamů vzorků bezvodé směsi, hydratované směsi po 6 a 12 cyklech na ultrazvukové lázni.

Na grafech č.15 a), b), c) jsou záznamy hydratované směsi cholesterolu a syntetického ceramidu v poměru 1:1 po 6 cyklech na třepačce. Vzorek byl změřen po cca 11 měsících stání ve víalce při pokojové teplotě. Během prvního ohřevu se na záznamu objevuje jeden ostrý endotermní pík s  $T_t$  79,3°C. Stáním vzorku došlo pravděpodobně k vytvoření homogenní hydratované směsi. Při druhém ohřevu dochází k rozpadu píku na dva, jejich  $T_t$  jsou 33,9°C a 64,1°C. Rozpad píku zapříčinilo nejspíše zahřátí směsi na vysokou teplotu. Teploty tání vorků č. 8-11 jsou souhrnně uvedeny v tabulce č.4.

Na grafu č.16 je záznam bezvodé směsi cholesterolu a syntetického ceramidu v poměru 1:5. Během prvního ohřevu je na záznamu pouze jeden ostrý pík při  $T_t$  84,1°C. Další

přeměna, která by teplotně odpovídala tání cholesterolu, na záznamu není patrná, z čehož usuzujeme, že se cholesterol ve směsi rozpouští. Při druhém ohřevu je viditelný také jeden pík při  $T_t$  76,0°C.

Na grafu č.17 je záznam hydratované směsi cholesterolu a syntetického ceramidu v poměru 1:5 po 6 cyklech na ultrazvukové lázni. Hydratací směsi dochází k posunu  $T_t$  k nižším hodnotám, při prvním ohřevu na 80,2°C, při druhém ohřevu na 74,0°C.

Na grafu č.18 je záznam hydratované směsi cholesterolu a syntetického ceramidu v poměru 1:5 po 12 cyklech na ultrazvukové lázni.  $T_t$  píku při prvním ohřevu je 81,1°C a při druhém ohřevu 74,0°C. Zvyšování počtu cyklů hydratace na ultrazvukové lázni, nemá na DSC záznam výrazný vliv.

Na grafu č.19 je záznam opakovaného měření vzorku hydratované směsi cholesterolu a syntetického ceramidu v poměru 1:5 po 12 cyklech na ultrazvukové lázni, vzorek stál cca 5 měsíců v uzavřeném vysokotlakém kelímku při pokojové teplotě. Měření je provedeno s chlazením na výchozí teplotu -60°C. Během prvního ohřevu je na záznamu výrazný pík tání volné vody při teplotě 3,4°C a při teplotě 66,1°C dochází k tání hydratované směsi. Během druhého ohřevu taje volná voda při teplotě 2,5°C a další výrazný pík se zde neobjevuje. Stáním vzorku při pokojové teplotě došlo k výraznějšímu posunu na nižší teplotu tání hydratované směsi během prvního ohřevu.

Na grafech č.20 a), b) je porovnání záznamů vzorku bezvodé směsi a vzorků hydratované směsi. Kalorimetrické charakteristiky jsou uvedeny v tabulce č.5.

Na grafech č. 21, 22, 23 je srovnání záznamů směsi cholesterolu a syntetického ceramidu v poměru 1:1 a 1:5.

#### 3.6.4 Hodnocení DSC záznamů směsi cholesterolu, syntetického ceramidu a kyseliny olejové

Na grafu č.24 je záznam bezvodé směsi cholesterolu, syntetického ceramidu a kyseliny olejové v poměru 4:8:1. Během prvního ohřevu se objevuje jeden výrazný pík při  $T_t$  80,8°C, při druhém ohřevu dochází k rozpadu tohoto píku v teplotní oblasti od 30-85°C.

Na grafu č.25 je záznam hydratované směsi cholesterolu, syntetického ceramidu a kyseliny olejové v poměru 4:8:1 po 6 cyklech na ultrazvukové lázni. Při prvním ohřevu je na záznamu viditelný protáhlý pík s maximem  $T_t$  76,8°C a ostrý pík s  $T_t$  104°C, tento pík při druhém ohřevu na záznamu chybí. Během druhého ohřevu se objevuje pouze protáhlý pík v teplotním rozmezí 60-70°C. Na grafu č.26 je srovnání bezvodého a hydratovaného vzorku.

Na grafu č.27 je záznam hydratované směsi cholesterolu, syntetického ceramidu a kyseliny olejové v poměru 4:8:1 po 6 cyklech na třepačce. Vzorek byl změřen po cca 11 měsících stání ve víalce při pokojové teplotě. Na záznamu prvního ohřevu je pouze jedna endotermní přeměna při teplotě 77,7°C. Dlouhou dobou inkubace se pravděpodobně vytvořila homogenní směs. Během druhého ohřevu se pík rozpadá na dva s  $T_t$  34,0°C a 62,9°C.

Na žádném ze záznamů se neobjevuje pík v teplotním rozmezí tání cholesterolu, z čehož usuzujeme, že se cholesterol ve směsi rozpouští. Kalorimetrické charakteristiky vzorků č.15-17 jsou uvedeny v tabulce č.6.

### 3.6.5 Makroskopické hodnocení vzorků

S využitím digitálního fotoaparátu jsme zachytili vzhled vzorků ve víálkách během jednotlivých cyklů hydratace. K hydrataci jsme využívali ultrazvukovou lázeň a jako druhou variantu třepačku. Jeden cyklus hydratace vzorku tvoří tři části, a to zahřívání vzorku na vodní lázni po dobu 20 minut při maximální teplotě 80°C, umístění vzorku na 20 minut do ultrazvukové lázně nebo na třepačku a stání vzorku při pokojové teplotě po dobu 20 minut.

#### a) Makroskopické hodnocení vzhledu vzorků po jednotlivých cyklech hydratace s využitím ultrazvukové lázně

Vzorky č.1-4 byly naváženy do viálek, k pevným látkám a směsím bylo dováženo 95% vody a takto připravené vzorky jsme podrobili dvanácti cyklům hydratace s využitím ultrazvukové lázně.

Vzorek č.1 obsahuje cholesterol a ultra čistou vodu, jeho vzhled se během dvanácti cyklů nezměnil, na pohled byly stále patrné shluky krystalů cholesterolu rozptýlené ve vodě.

Vzorek č.2 obsahuje syntetický ceramid s ultra čistou vodou, hned po prvním cyklu hydratace se vytvořil poměrně pevný precipitát a jeho vzhled se dále jednotlivými cykly neměnil, ve vodě po jednotlivých cyklech vznikala mléčná zákal.

Vzorek č.3 obsahuje směs cholesterolu, syntetického ceramidu v poměru 1:5 a ultra čistou vodu, vzorek č.4 obsahuje směs cholesterolu, syntetického ceramidu v poměru 1:1 a ultra čistou vodu, u těchto vzorků se také hned po prvním cyklu hydratace vytváří poměrně pevný precipitát, jehož vzhled se dále jednotlivými cykly neměnil, ve vodě se po jednotlivých cyklech tvořil mléčný zákal.

Vzorek č.5 obsahuje cholesterol, syntetický ceramid, kyselinu olejovou v poměru 4:8:1 a ultra čistou vodu. Na výřezech 1.-3. jsou zachyceny čtyři cykly hydratace. Vzhled vzorku se mění od navážení, kdy jsou ve viálce patrné jednotlivé shluky směsi, a postupně se s přibývajícím cykly vytváří precipitát a mléčný zákal vody.

#### b) Makroskopické hodnocení vzhledu vzorků po jednotlivých cyklech hydratace s využitím třepačky

Vzorky č.6-9 byly naváženy do viálek, k pevným látkám a směsím bylo dováženo 95% vody a takto připravené vzorky jsme podrobili šesti cyklům hydratace s využitím třepačky.

Vzorek č.6 obsahuje cholesterol, přírodní ceramid v poměru 1:1 a ultra čistou vodu. Na fotografiích je jeden cyklus hydratace, postupně se ve viálce tvoří mléčný zákal.



Vzorek č.7 obsahuje cholesterol, syntetický ceramid v poměru 1:1 a ultra čistou vodu. Na fotografiích je jeden cyklus hydratace, ve víálce vzniká precipitát a mnohem slabší mléčný zákal než u vzorku č.6.

Vzorek č.8 obsahuje cholesterol, syntetický ceramid, kyselinu olejovou v poměru 4:8:1 a ultra čistou vodu. Po prvním cyklu hydratace se vytváří precipitát a velmi slabý mléčný zákal. Porovnáme-li výřez stejného cyklu hydratace s využitím ultrazvukové lázně u vzorku č.5, je mléčný zákal mnohem intenzivnější než u vzorku č.8, kde byla k hydrataci využita třepačka.

Vzorek č.9 obsahuje cholesterol a ultra čistou vodu. Vzhled vzorku se po prvním cyklu hydratace nezměnil, nevzniká precipitát, ve víálce jsou stále patrné jednotlivé shluky krystalů cholesterolu ve vodě.

### 3.6.6 Hodnocení mikroskopických preparátů

Mikroskopické preparáty jsme připravovali dvěma způsoby, a to rozetřením pevné látky nebo směsi v kapce ultra čisté vody nebo odebráním vzorku z viálky, v níž vzorky prodělaly hydrataci.

#### a) Hodnocení pevných látek nebo směsí rozetřených v kapce ultra čisté vody

Jedná se o preparáty:

č.1 cholesterol - na snímku je krystal cholesterolu

č.2 přírodní ceramid – na snímku jsou viditelné jednotlivé tyčinky

č.3 syntetický ceramid – na rozdíl od přírodního ceramidu netvoří jednotlivé tyčinky, ale vidíme neoddělené shluky

č.4 směs cholesterolu a přírodního ceramidu v poměru 1:1 – na snímku nejsou viditelné krystaly cholesterolu, došlo pravidelnému uspořádání obou složek do kulovitých útvarů

č.5 směs cholesterolu a syntetického ceramidu v poměru 1:1 – také zde nejsou krystaly cholesterolu a vytváří se kulovité shluky obou složek

č.6 směs cholesterolu, syntetického ceramidu a kyseliny olejové v poměru 4:8:1 – ani u této směsi nejsou krystaly cholesterolu a všechny složky tvoří drobnější shluky .

#### b) Hodnocení vzorků podrobených hydrataci

Jedná se o preparáty :

č.7 cholesterol a voda po 12 cyklech hydratace na ultrazvukové lázni – na snímku jsou patrné krystaly cholesterolu rozbité ultrazvukem

č.8 syntetický ceramid a voda po 12 cyklech hydratace na ultrazvukové lázni – snímek je téměř shodný s preparátem č.3, ultrazvuk tedy neměl na vzhled syntetického ceramidu vliv

č.9 směs cholesterolu, syntetického ceramidu v poměru 1:1 a vody po 12 cyklech hydratace na ultrazvukové lázni – porovnáme-li tento snímek s preparátem č.5, vidíme , že ultrazvuk rozbil velké shluky směsi na drobnější shluky kulovitěho tvaru

č.10 směs cholesterolu, syntetického ceramidu, kyseliny olejové v poměru 4:8:1 a vody po 6 cyklech hydratace na ultrazvukové lázni – porovnáme-li tento snímek s preparátem č.6, vidíme že ultrazvuk rozbil směs na velmi drobné shluky

č.11 směs cholesterolu, přírodního ceramidu v poměru 1:1 a vody po 6 cyklech hydratace na třepačce – na snímku jsou porovnatelné kulovité útvary jako u vzorku č.4

č.12 cholesterol a voda po 6 cyklech hydratace na třepačce – na snímku jsou krystaly cholesterolu, třepačka nezpůsobila jejich rozbití

č.13 směs cholesterolu, syntetického ceramidu v poměru 1:1 a vody po 6 cyklech hydratace na třepačce – na snímku jsou porovnatelné shluky směsi jako u preparátu č.5, třepačka tedy nerozbila shluky na drobnější

č.14 směs cholesterolu, syntetického ceramidu, kyseliny olejové v poměru 4:8:1 a vody po 6 cyklech hydratace na třepačce – třepačka nerozbila shluky směsi na tak drobné útvary jako u preparátu č.10

č.15 směs cholesterolu, syntetického ceramidu v poměru 1:5 a vody po 12 cyklech hydratace na ultrazvukové lázni – u tohoto vzorku se vytvořily kulovité útvary, porovnáme-li je se vzorkem č.9, který se liší pouze poměrem obou složek vzorku, vidíme že ultrazvuk nerozbil kulovité útvary na tak drobné shluky

## 4. Závěr

### 4.1 DSC

1. Bezvodý cholesterol má při ohřevu vzorku na DSC záznamech 2 endotermní přeměny. Při teplotě kolem 40°C dochází k polymorfní krystalické přeměně bezvodého cholesterolu a kolem teploty 151°C cholesterol taje a mění se na kapalinu.

2. U vzorků hydratovaného cholesterolu, u nichž byla použita ultrazvuková lázeň, se na záznamu prvního ohřevu objevují 4 endotermní píky. První a druhý pík se k sobě vlivem delší doby inkubace vzorku teplotně přibližují. Dá se předpokládat, že prodloužením doby inkubace za pokojové teploty by došlo ke sloučení obou píků v jeden. Zvyšování počtu cyklů hydratace nemá na vzorek výrazný vliv.

3. U vzorku hydratovaného cholesterolu, u kterého byla využita třepačka, se objevují během prvního ohřevu pouze 3 endotermní přeměny. Při teplotě 84,3°C cholesterol monohydrát ztrácí vodu a přechází polymorfní přeměnou na bezvodý cholesterol, při teplotě 121,5°C dochází k přechodu bezvodého cholesterolu v přítomnosti nadbytku vody na fázi kapalných krystalů ve smektickém stavu, k tání a ke vzniku kapaliny dochází při teplotě 154,6°C. Vzorek byl měřen po cca 11 měsících inkubace při pokojové teplotě.

4. Na záznamech druhého ohřevu vzorků hydratovaného cholesterolu, lišících se způsobem hydratace i dobou inkubace, se objevují 3 endotermní přeměny, které jsou teplotně téměř shodné. První pík je při teplotě 94°C, druhý pík při ~120°C a třetí při ~155°C.

5. Na DSC záznamu ohřevu bezvodého syntetického ceramidu se objevuje jeden endotermní pík. Vlivem hydratace vzorku dochází při ohřevu k posunu píku k nižším teplotám. Záznamy vzorku po 6 cyklech a po 12 cyklech hydratace na ultrazvukové lázni, jsou teplotně totožné. Zvyšování počtu cyklů hydratace nemá tedy na DSC záznam výrazný vliv.

6. Cholesterol je schopen ve směsích vytvořit homogenní gelovou fázi jen do určitého množství, kdy dojde k jeho rozpuštění ve směsi. Přesáhneme-li toto množství, dojde k vypadávání čistého krystalického cholesterolu.

Vypadávání cholesterolu ze směsi se nám na DSC záznamech objevuje u bezvodé i hydratované směsi cholesterolu a syntetického ceramidu v poměru 1:1.

Na DSC záznamech vzorků směsi cholesterolu a syntetického ceramidu v poměru 1:5 se objevuje pouze jeden endotermní pík, což svědčí o rozpouštění cholesterolu ve směsi.

Hydratací směsi dochází k posunu teplot tání na nižší hodnoty, avšak zvyšování počtu cyklů hydratace na ultrazvukové lázni nemá na DSC záznam výrazný vliv.

7. Cholesterol se v bezvodé i hydratované směsi cholesterolu, syntetického ceramidu a kyseliny olejové v poměru 4:8:1 rozpouští, na DSC záznamech se neobjevuje pík v teplotním rozmezí tání cholesterolu. K vytvoření homogenní hydratované směsi dochází pravděpodobně dlouhou dobou inkubace při pokojové teplotě, kdy na záznamu prvního ohřevu je viditelná pouze jedna endotermní přeměna.

#### 4.2 Makroskopický vzhled vzorků

1. Ve viálkách, v nichž je obsažen cholesterol v nadbytku vody, zůstávají po jednotlivých cyklech hydratace s využitím ultrazvukové lázně nebo třepačky shluky krystalů rozptýlené ve vodě. U všech ostatních vzorků se hned po prvním cyklu hydratace vytváří precipitát a postupně i různě intenzivní mléčný zákal vody.

2. U vzorků, kde jsme používali k hydrataci ultrazvukovou lázeň je mléčný zákal vody intenzivnější. Další zvyšování počtu cyklů hydratace nemá na makroskopický vzhled vzorků výrazný vliv.

#### 4.3 Mikroskopické preparáty

1. Na mikroskopickém preparátu bezvodého cholesterolu jsou viditelné jednotlivé krystaly ve tvaru plochých destiček, u vzorku přírodního ceramidu jsou patrné jednotlivé tyčinky, avšak syntetický ceramid tvoří neoddělené shluky.

2. U vzorků bezvodých i hydratovaných směsí, v nichž je obsažen cholesterol, vidíme poměrně pravidelné kulovité útvary tvořené složkami směsi, chybí zde krystaly cholesterolu. Ve směsích tedy dochází k rozpuštění cholesterolu, což nám potvrzují i DSC záznamy.

3. Ultrazvuková lázeň použitá na hydrataci vzorků rozbíjí krystaly a kulovité shluky na menší útvary. Vhodnější variantou hydratace vzorku je tedy pomocí třepačky, která velikost částic neovlivňuje.

## 5. Seznam literatury

1. **Roberts, M.S.** : Skin structure and function. University of Queensland, Australia, Proceedings of a preconference course at the 9th Biennial International Conference of Perspectives in Percutaneous Penetration, April 13, 2004, 4-7
2. **Bouwstra, J.A., et al.** : Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. *Progress in Lipid Research*, vol. 42, 2003, 1-36
3. **Kathi C Madison** : Barrier Function of the Skin : „ La Raison d'Être“ of the Epidermis. *Journal of Investigative dermatology*, vol. 121, 2003, 231-241
4. **Pilgram, G.S.K., et al.** : Study on the lipid organization of stratum corneum lipid models by (cryo-) electron diffraction. *The Journal of Lipid Research*, vol. 39, August 1998, 1669-1676
5. **Plasencia, I., Norlén, L., Bagatolli, L.A.** : Direct visualisation of lipid domains in human skin stratum corneum's lipid membranes: effect of pH and temperature. *Biophys J BioFAST*, July 13, 2007, 1- 21
6. **Chalabala, M., et al.** : Technologie léků. Galén, druhé přepracované a doplněné vydání, Praha, 1997, 2001, 407s
7. [http://www.uochb.cas.cz/Zpravy/PostGrad2005/5\\_Svoboda.pdf](http://www.uochb.cas.cz/Zpravy/PostGrad2005/5_Svoboda.pdf)
8. <http://www.lci.kent.edu/lcimages.html>
9. <http://www.avcr.cz/data/vzdelavani/dsc/udeleni/kratochvil teze dsc.pdf>
10. **Rapaport, H., et al.** : Cholesterol Monohydrate Nucleation in Ultrathin Films on Water. *Biophysical Journal*, vol. 81, November 2001, 2729-2736
11. <http://www.sekk.cz/Prodej/Encyklopedie/SJATP.htm>
12. **Brandenburg, K., et al.** : What can calorimetry tell us about changes of three-dimensional aggregate structures of phospholipids and glycolipids?. *Thermochimica Acta* 445, 2006, 133-143
13. **Loomis, C.R., Shipley, G.G., Small D.M.** : The phase behavior of hydrated cholesterol. *Journal of Lipid Research*, vol. 20, 1979, 525-535
14. **Ruthven, N., A., H., Lewis, et al.,** : Differential scanning calorimetry in the study of lipid phase transition model in biological membranes. *Methods in molecular biology*, vol. 400, *Methods in membrane lipids*, 171-195
15. **Shieh, H.S., Hoard L.G., Nordman C.E.** : Crystal structure of anhydrous cholesterol. *Nature*, 1977, 287-289

16. **Craven, B.M., et al.** : Crystal structure of cholesterol monohydrate. *Nature*, 1976, 727-729
17. **Leh-Yeh-Hsu, Nordman C.E.** : Phase Transition and Crystal Structure of the 37°C Form of Cholesterol, *SCIENCE*, vol .22, May 1983, 604-606
18. **Epand, R.M., et al.,** : A New High-Temperature Transition of Crystalline Cholesterol in Mixtures with Phosphatidylserine. *Biophysical Journal*, vol. 81, September 2001, 1511-1520
19. **De Kruffyff, B., et al.,** : Non-random distribution of cholesterol in phosphatidylcholine bilayers. *Biochim Biophys Acta*, 1974, 356, 1-7
20. **Konrádová, V.; Uhlík, J.; Vajner,L.** : Funkční histologie. H&H, druhé vydání, Jinočany, 2000, 291s
21. **Nožičková, M., et al.** : Vybrané kapitoly z dermatovenerologie. Karolinum, Praha, 2003, 155s
22. **Inoue, T.; Tsujii, K.; Toda K.** : Differential scanning calorimetric studies on the melting behavior of water in stratum corneum. *J Invest Dermatol.*, 1986 Jun, 86(6), 689-693
23. **Takahashi, H., et al.** : Behavior of ice-water transition in dimyristoylphosphatidylethanolamine-water system. *Thermochimica Acta*, 303, 1997, 93-99
24. **Aoki, H., Kodaky, M.** : Calorimetric investigation of the behavior of interlamellar water in phospholipid-water system. *Thermochimica Acta*, 308, 1998, 77-83
25. **Kodama, M., Kato, H., Aoki, H.** : The behavior of water molecules in the most stable subgel phase of dimyristoylphosphatidylethanolamine-water system as studied by differential scanning calorimetry. *Thermochimica Acta*, 352-353, 2000, 213-221
26. **Aoki, H., Kodama, M.** : Water behavior in the conversion process of gel-to-subgel phase in dimyristoylphosphatidylethanolamine-water system as studied by DSC. *Thermochimica Acta*, 431, 2005, 182-187
27. **Miranda, W. de Jager, et al.** : Novel lipid mixtures based on synthetic ceramides reproduce the unique stratum corneum lipid organization. *Journal of Lipid Research*, vol. 45, 2004, 923-932
28. **Hrabálek, A.; Vávrová, K.** : Role ceramidů v kůži. *Praktické lékařství*, vol. 2, 2006, 55-58
29. **Bouwstra, J.** : Instrumental methods for evaluating skin. University of Leiden , the Netherlands, Proceedings of a preconference course at the 9th Biennial International Conference of Perspectives in Percutaneous Penetration, April 13, 2004, 23-26

30. **Hrabálek, A.; Vávrová, K.** : Lze překonat kožní bariéru?. Praktické lékárenství, vol. 1, 2005, 8-11
31. **Lars Norlén, et al.** : Skin barrier structure and function: The single gel phase model. Journal of investigative dermatology, 117, 2001, 830-836
32. **Scheffer, L., et al.,** : Structure of cholesterol/ceramide monolayer mixtures: Implications to the molecular organization in lipid rafts. Biophysical Journal, vol. 88, May 2005, 3381-3391
33. **Elias, P.M., et al.,** : The potential of metabolit interventions to enhance transdermal drug delivery. Journal of investigative dermatology, vol. 7, 2002, 79-85
34. <http://www.netwellness.org/healthtopics/skincare/introduction.cfm>
35. **Juyang Huang, Gerald W. Feigenson,** : A microscopic interaction model of maximum solubility of cholesterol in lipid bilayers. Biophysical Journal, vol. 76, April 1999, 2142-2157